ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA

microbiologia generalis,
agrobiologica et technica

Vol. VIII No 3–4

1 9 5 9

COMMONWEALTH MYCOLOGICAL INSTITUTE
24 JUN 1960

PRZEPISY AUTORSKIE

Jako materiał publikacyjny mogą być nadsyłane rozprawy i komunikaty dotyczące prac oryginalnych z dziedziny mikrobiologii ogólnej, rolniczej i przemysłowej, nigdzie dotychczas nie publikowane, a referowane uprzednio na posiedzeniu Oddziału Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów lub innego towarzystwa naukowego. Czasopismo zamieszcza również referaty przeglądowe.

Jednostronne maszynopisy o podwójnych odstępach, z marginesem 4 cm należy przesyłać w 2 egz. na ręce sekretarza: Redakcja *„Acta Microbiologica Polonica"*, Wrocław, ul. Siemieńskiego 14/8.

Do prac pisanych po polsku należy dołączyć streszczenie rosyjskie, angielskie, francuskie lub niemieckie. Streszczenia powinny zawierać zasadnicze konkluzje pracy i nie powinny przekraczać 15% tekstu. Prace w obcym języku (rosyjski, angielski, francuski lub niemiecki) mogą być nadsyłane po uprzednim porozumieniu się z redakcją; należy do nich dołączyć streszczenie polskie. Każda praca powinna być zaopatrzona w tytuł w języku publikacji oraz streszczenia, nazwisko i inicjały autora (ów), nazwę i adres zakładu, w którym wykonano pracę.

Pożądany jest następujący układ prac: a) krótki wstęp, b) metody badania, c) wyniki, d) dyskusja i wnioski, e) krótkie streszczenie w języku polskim — nie więcej niż 3% tekstu, f) piśmiennictwo, g) streszczenie obcojęzyczne.

Prace należy ujmować treściwie, wstęp powinien zawierać tylko dane bezpośrednio odnoszące się do opracowanego tematu; metody należy opisać krótko: tam gdzie to możliwe powoływać się na oryginalne opisy metod.

Wyniki mogą być ilustrowane tablicami i wykresami, należy jednak unikać tablic i wykresów dla przedstawienia tych samych danych. Wykresy i tablice powinny być możliwie przejrzyste i nieskomplikowane i ilustrować zasadnicze, istotne wyniki. Rysunki i wykresy można dostarczać w czytelnych szkicach ołówkowych na brystolu, każdy na oddzielnej kartce, zaopatrzonej na odwrocie w wypisane ołówkiem: tytuł pracy, nazwisko autora oraz numer rysunku lub wykresu. Objaśnienia do rysunków i wykresów należy dołączyć na osobnej kartce z wyraźnym zaznaczeniem numeru rysunku (wykresu). W objaśnieniach należy podawać skalę lub wielokrotność powiększenia. Fotografie powinny być kontrastowe, na matowym papierze. Ilość tablic i rysunków musi być ograniczona do minimum.

W maszynopisie należy zaznaczyć miejsce, w którym ma być umieszczony rysunek (wykres, fotografia).

Przy powoływaniu się na piśmiennictwo należy podać nazwiska autorów i rok publikacji, np. Prażmowski (1879) lub (Prażmowski 1879). Jeżeli praca cytuje więcej niż jedną publikację danego autora z tego samego roku, należy to uwidocznić dodając małe litery (np. 1887 a, 1887 b itd.).

Wykaz cytowanych prac (piśmiennictwo) powinien być sporządzony w układzie alfabetycznym i powinien zawierać następujące elementy: nazwisko i inicjały autora (ów), kropka, rok, kropka, tytuł pracy, nazwa czasopisma w przyjętych skrótach, tom (ewentualnie zeszyt), stronica czasopisma; w wypadku cytowania książki: nazwisko i inicjały autora (ów), rok wydania, tytuł książki, wydanie, miejsce i wydawca, ewentualnie stronica tekstu.

W tekście i tablicach należy stosować przyjęte skróty, np. ml — a nie ccm, g — a nie gr, 100° — a nie 100°C, M — molarny, N — normalny itd.

Przy opisie roztworów należy rozróżnić „%" — g na 100 g roztworu, „% objętościowy" — ml na 100 ml roztworu, „stężenie procentowe" — g na 100 ml rozpuszczalnika.

Nazwy drobnoustrojów należy podawać w brzmieniu łacińskim, przy pierwszym wzmiankowaniu — w pełnym brzmieniu. Dopuszczalne jest również jednoczesne podawanie przyjętych ogólnie nazw polskich. W dalszym tekście nazwy rodzajowe (nie gatunkowe) należy skracać lub podawać tylko nazwy polskie.

Autor otrzymuje 25 odbitek bezpłatnie: o dodatkowe odbitki autor może zwrócić się do redakcji przy składaniu maszynopisu.

Członkowie Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów otrzymują „Acta" bezpłatnie, po przekazaniu dodatkowej składki rocznej w wysokości 70,— zł do Sekcji Mikrobiologii Ogólnej PTM (adres: Redakcja *„Acta Microbiologica Polonica"*, Wrocław, ul. Siemieńskiego 14, m. 8).

POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW
SEKCJA MIKROBIOLOGII OGÓLNEJ, ROLNICZEJ I PRZEMYSŁOWEJ

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA

microbiologia generalis,
agrobiologica et technica

Vol. VIII No 3 – 4

1959
PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE

RADA REDAKCYJNA

Przewodniczący: Jadwiga Ziemięcka, członek rzeczywisty PAN — Lublin, Kazimierz Bassalik, członek rzeczywisty PAN — Warszawa, Józef Heller, członek-korespondent PAN — Warszawa, Jadwiga Jakubowska — Łódź, Aniela Kozłowska — Kraków, Władysław Kunicki-Golfinger — Wrocław, Eugeniusz Pijanowski, członek-korespondent PAN — Warszawa, Feliks Przesmycki — Warszawa

KOMITET REDAKCYJNY

Redaktor naczelny — Władysław Kunicki-Goldfinger
Dział rolny — J. Gołębiowska, Poznań
Dział przemysłowy — J. Jakubowska, Łódź

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE
ODDZIAŁ WROCŁAWSKI

Nakład 1106+124 egz.	Oddano do składania 1. VII. 1959 r.
Ark. wyd. 12,5 druk. 10,25	Podpisano do druku 23. I. 1960 r.
Pap. druk. sat. kl. III, 80 g, 70×100	Druk ukończono w styczniu 1960 r.
Cena zł 50,—	Zam. nr 142/59 L-11

WROCŁAWSKA DRUKARNIA NAUKOWA

Sprawozdanie

Z Konferencji Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów

SYMBIOTYCZNE WIĄZANIE WOLNEGO AZOTU PRZEZ *RHIZOBIUM*

Puławy, Instytut Uprawy, Nawożenia i Gleboznawstwa
16 - 17 grudnia 1958

Proceedings

of the Symposium of the Polish Microbiological Society on:

SYMBIOTIC FIXATION OF FREE NITROGEN BY *RHIZOBIUM*

Puławy, Instytut Uprawy, Nawożenia i Gleboznawstwa
16 - 17 December 1958

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1959, 8 : 209—223

J. Marszewska-Ziemięcka

Z ZAGADNIEŃ CYTOLOGII I FIZJOLOGII *RHIZOBIUM*

Referat przeglądowy

Z Zakładu Mikrobiologii Rolniczej Instytutu Uprawy, Nawożenia i Gleboznawstwa w Puławach

Symbiotyczne wiązanie wolnego azotu, przemiana wolnego azotu w białko bakterii i roślin, to jedno z najciekawszych zjawisk biologicznych. Ma ono też, jak wiadomo, wielkie znaczenie rolnicze. Zjawisko to badano dotychczas głównie u roślin motylkowych, mimo że występowanie jego notujemy także wśród różnych innych grup roślinnych. Celem obecnej konferencji jest próba zobrazowania aktualnego stanu naszych zainteresowań i wiadomości o warunkach powstawania tego zjawiska i o jego naturze u roślin motylkowych. Rozpoczynamy naszą konferencję przeglądem niektórych nowszych badań nad naturą partnera bakteryjnego w tej symbiozie, którym jest *Rhizobium*.

FILOGENEZA I SYSTEMATYKA *RHIZOBIUM*

Według B o n d a (1956) u roślin motylkowych wytwarzanie narośli korzeniowych i wiązanie w nich wolnego azotu przez swoiste bakterie jest właściwością filogenetycznie bardzo dawną, bo datującą się od czasów okresu kredowego. Mimo to rozwój tej symbiozy trwa nadal, wynikając z zapotrzebowania azotu przez roślinę i źródeł energii przez heterotroficzne bakterie brodawkowe (por. też N o r r i s 1956).

Ścisłe współżycie roślin z tymi bakteriami formowało się stopniowo. Bytujące w glebie bakterie zaczęły wnikać do korzeni. Pod ich wpływem roślina zaczęła organizować specjalne organy służące do wiązania wolnego azotu — narośla korzeniowe. Stały się one miejscem rozwoju i pracy asymilacyjnej bakterii brodawkowych.

P a r k e r (1957) sądzi, że u podstawy tej symbiozy nie było zjawisk pasożytnictwa. J e n s e n (1952) dowodzi natomiast, że *Rhizobium* pochodzi

od zjadliwych dla roślin *Corynebacterium*. Wg Allenów (1958) pochodzenie *Rhizobium* nie zostało dotychczas wyjaśnione.

Systematyka (Bergey 1948) zalicza te bakterie do rodziny *Rhizobiaceae* Conn, jako rodzaj *Rhizobium* Franck wraz z rodzajami *Chromobacterium* i *Agrobacterium*, wśród których istnieją też formy pasożytnicze (np. *tumefaciens*). Bisset (1956), na podstawie podobieństwa budowy błony komórkowej i innych cech, widzi pokrewieństwo filogenetyczne *Rhizobium* z rodzajem *Bacillus*.

Nazwa rodzajowa *Rhizobium* utrzymuje się dzisiaj powszechnie, mimo że odkrywca tych bakterii — Beijerinck (1888) — nazywał je, jak wiadomo, *Bacillus radicicola*, a znakomity nasz morfolog Adam Prażmowski (1889) nadał im nazwę *Bacterium radicicola*.

CECHY GATUNKOWE *RHIZOBIUM*

Wielka ilość badań nad morfologią, fizjologią i właściwościami hodowlanymi tych bakterii wykazała tak wielką ich zmienność szczepową, że, jak przyjmują Krasilnikow (1949), Bonnier (1953), Allenowie (1958) i inni, różnice gatunkowe czy też grupowe w obrębie rodzaju *Rhizobium* można określić jedynie na podstawie swoistych zdolności do zakażania określonych rodzajów roślin. Jest to bowiem cecha stosunkowo najbardziej ustalona. Bonnier (1953) uważa jednak *Rhizobium* za rodzaj złożony z form podlegających stałej ewolucji pod wpływem warunków zewnętrznych i współżycia z roślinami.

Jak podają Allenowie (1958), dzisiejszy podział *Rhizobium* obejmuje tylko 6 gatunków. Są to: *Rh. meliloti*, *Rh. trifolii*, *Rh. leguminosarum*, *Rh. phaseoli*, *Rh. japonicum* i *Rh. lupini*. Oprócz nich istniałyby szczepy właściwe kilkunastu innym grupom roślin motylkowych i mające zdolności „krzyżowego zakażania" roślin („cross inoculation groups"). Zdolności te mają również „gatunki" *Rh. japonicum* i *Rh. lupini*. Właściwie więc wg Allenów można by rozróżnić zaledwie cztery odrębne gatunki *Rhizobium*.

RÓŻNICE GRUPOWE

Dotychczas znaleziono tylko niewiele odrębnych cech fizjologicznych i hodowlanych wśród szczepów *Rhizobium*.

Do cech różnicujących można zaliczyć szybkość wzrostu i ilość wytwarzanego śluzu. Pod tym względem dzielimy rizobia na szczepy rosnące szybko i wytwarzające dużo śluzu o rzadkiej konsystencji oraz szczepy, które rosną powoli i dają twardsze kolonie. Jak wiadomo, do pierwszych należą bakterie z grup *Rh. leguminosarum*, *Rh. trifolii*, *Rh. phaseoli* oraz *Rh. meliloti*. Wolno natomiast rosną bakterie soi, łubinu i seradeli. Przy tym, wg Leifsona i Erdmana (1958), szczepy szybko rosnące są

urzęsione peritrichalnie, a powoli rosnące mają po 1 rzęsce subpolarnej. Wg Kobusa (1952) szczepy szybko rosnące wytwarzały też na ogół większe ilości kwasów i mogły znosić wyższe stężenia fioletu krystalicznego, podczas gdy rosnące powoli były o wiele wrażliwsze na ten barwik i prawie nie zakwaszały pożywek cukrowych, a nawet mogły je alkalizować. W obrębie grupy bakterii szybko rosnących cechy te były mniej ustalone. Na ogół nie znaleziono też związku między zdolnością asymilowania azotu i różnymi cechami hodowlanymi.

POKREWIEŃSTWA SEROLOGICZNE SZCZEPÓW

Z naszych badaczy Białosuknia i Klott (1923) spodziewali się swego czasu, że poznanie budowy antygenowej różnych szczepów *Rhizobium* ułatwi ich klasyfikację grupową. Stwierdzili oni jednak, że nawet w tej samej roślinie mogą osiedlać się szczepy serologicznie różne i że tylko w poszczególnych brodawkach mamy do czynienia z jednym szczepem *Rhizobium*. Chociaż nieprzydatne dla celów systematyki, metody serologiczne, ze względu na stałość budowy antygenowej poszczególnych szczepów, mogą mieć jednak dużą wartość przy identyfikowaniu szczepów w hodowlach lub w naroślach korzeniowych.

Współczesne badania Kleczkowskiego i Thorntona (1944), Vincenta (1949) i innych w zasadzie potwierdziły wnioski naszych badaczy. Pomiędzy budową antygenową (antygeny *O* i *H*), opornością na fagi, zdolnością wiązania wolnego azotu oraz innymi cechami fizjologicznymi i hodowlanymi — nie znaleziono korelacji. Wprawdzie wyróżniono w rodzaju *Rhizobium* 3 odrębne grupy serologiczne: 1) bakterie lucerny, 2) bakterie koniczyny i grochu, oraz 3) powoli rosnące bakterie łubinu i soi, ale nie wszyscy badacze to potwierdzili (Stein, 1953). Thornton i Nutman (1952) sądzą, że w historycznym rozwoju *Rhizobium* zróżnicowanie antygenowe tych bakterii poprzedziło powstawanie ich odrębnych ras.

Pochon, Manil i kilku innych badaczy (1950, 1958) twierdzą nadal, że oznaczenia serologiczne *Rhizobium* mogą ułatwiać badanie konkurencji pomiędzy szczepami zakażającymi rośliny i mającymi różne uzdolnienia asymilacyjne.

Sprawy te omówi bliżej Drożańska, która przedstawi na naszej konferencji niektóre wyniki swoich badań nad pokrewieństwem serologicznym kilkudziesięciu szczepów *Rhizobium*.

CYKL ROZWOJOWY *RHIZOBIUM*

W ciągu ostatnich lat wznowiono badania nad cyklem rozwojowym, przez który przechodzą te bakterie podczas samodzielnego bytowania w glebie i po zagnieżdżeniu się w brodawkach korzeniowych swych roślin-

nych gospodarzy. Teorię Bisseta (1951) — dużych i małych cyklów rozwojowych przedstawi Lorkiewicz w swym referacie poświęconym genetyce *Rhizobium*. W referacie jego mają też być omówione interesujące badania Stappa i Knösela (1954) nad zjawiskami płciowymi u *Rhizobium*.

CYTOLOGIA *RHIZOBIUM*

Rozwijające się metody cytochemiczne oraz zastosowanie mikroskopów elektronowego i fluorescencyjnego pogłębiły nasze wiadomości o budowie *Rhizobium* i o ich składzie chemicznym.

Voets (1949), Bergersen (1955), Bisset i Hale (1951 i 1952) oraz Lawrence (1955) stwierdzają obecność w komórkach *Rhizobium* jąder otoczonych osłonką lipoidalną i dzielących się na pochodne. Jądra pochodne przechodzą z prążkowanych starszych pałeczek do pływek, które powstają, jak sądzi Bisset, z rozpadu pałeczki na kilka ruchliwych tworów. Wg Bisseta i Hale'a pływki te mogą koniugować ze sobą i dawać początek dwujądrowym laseczkom.

Lawrence (1955) opisuje wytwarzanie przez rizobia drobnych (0,3 μ) przesączalnych gonidii, z których mogą rozwijać się nowe kolonie bakterii. Jak sądzi radziecki uczony Petersen (1955), z form tych mogą powstawać uaktywnione szczepy dzięki oddziaływaniu na nie hodowlami innych bakterii.

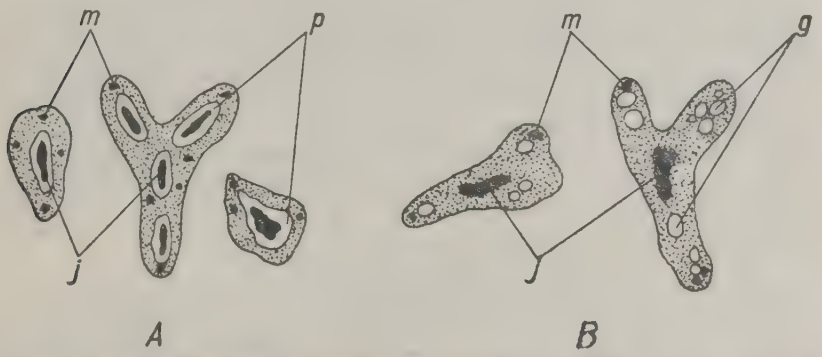
Za najciekawsze fazy w cyklu rozwojowym *Rhizobium* uważane są ich przekształcenia w bakteroidy. Utwory te, powstające normalnie w brodawkach korzeniowych roślinnego partnera, mogą też w nieco podobnej postaci wytwarzać się *in vitro* pod wpływem alkaloidów (Bazarewski 1929, Sembratówna 1934 i inni), glukozydów i — jak podaje Heumann (1952a) — także pod wpływem krwi. To ostatnie spostrzeżenie wydaje się specjalnie ciekawe ze względu na to, że podczas aktywnej symbiozy w naroślach korzeniowych gromadzi się tzw. leghemoglobina bardzo zbliżona do hemoglobiny zwierzęcej. Może więc pigment ten ma jakiś wpływ na przekształcanie się pałeczek *Rhizobium* w charakterystycznie zdeformowane bakteroidy.

Przekształcenia te odbywają się stopniowo. W ładnych zdjęciach wykonanych z pomocą mikroskopu elektronowego ukazał nam Ziegler (1956) bakteroidy z młodych brodawek fasoli. Widzimy, że są to pałeczki z długimi rzęskami osadzonymi na podstawach.

Wg Spichera (1954) w aktywnych brodawkach łubinu i seradeli znajduje się zaledwie kilka procent postaci przekształconych w zdeformowane i nieczynne bakteroidy. Być może, iż Heumann (1952b) obserwował wciąż jeszcze aktywne, młode komórki symbiotyczne z narośli

korzeniowych. Twierdzi bowiem, że bakteroidy mogą się mnożyć przez podział, czemu jednak przeczą inni badacze.

Bergersen (1955) opublikował bardzo interesujący opis bakteroidów z narośli korzeniowych *Trifolium subterraneum* L. Przy użyciu różnych metod barwienia substancji jądrowej bakteroidów oraz podczas oglądania w mikroskopie kontrastowo-fazowym komórek żywych i zabitych znalazł różnice w budowie komórek bakteroidów pochodzących z brodawek korzeniowych aktywnych i z brodawek nieczynnych pod względem wiązania wolnego azotu.



Rys. 1. Komórki bakteroidów *Rhizobium* (wg Bergersena, 1958): A — ze szczepów aktywnych, B — ze szczepów nieaktywnych, j — jądra, p — strefy perinuklearne, m — mitochondria, g — glikogen;

Bakteroidy szczepów energicznie wiążących wolny azot w symbiozie z rośliną mają, wg jego rysunku, aparat jądrowy w postaci substancji chromatynowej umieszczonej wzdłuż osi komórki. Wokół tych utworów rozwija się strefa okołojądrowa czyli „perinuklearna", pochodzenia chromatynowego i mająca cechy zasadowe. Bakteroid czynnych szczepów zawiera w swej komórce 1-4 takich stref centralnych. Są one otoczone cytoplazmą, w której rozmieszczone są ziarnistości, uważane przez tego badacza za odpowiedniki mitochondrii. Mitochondria te są ośrodkiem oddychania i metabolizmu komórek, zawierają one bowiem oksydazę cytochromową i enzymy potrzebne do utleniania i redukcji, między innymi fosfatazę. Sama substancja jądrowa brałaby mały udział w procesach oddechowych bakteroidów.

Bakteroidy szczepów nieuzdolnionych do wiązania wolnego azotu, czyli nieaktywnych, zbudowane są inaczej. Nie mają one chromatynowych centrów perinuklearnych i wytwarzają materiał zapasowy — glikogen. Węglowodan ten gromadzi się w bakteroidach nieczynnych, w okresie

głodu azotowego. Jest to zjawisko analogiczne do nagromadzania się skrobi w nieczynnych brodawkach korzeniowych czy też w innych partiach rośliny niedostatecznie odżywionej pokarmami azotowymi.

Mimo licznych badań nie wiemy dotychczas, w jakiej fazie przemiany w bakteroidy pałeczki nabierają zdolności asymilowania wolnego azotu i kiedy ją zatracają. Między innymi Konokotina (1934) sądzi, że wolny azot wiążą tylko młode bakteroidy. Należałoby też zbadać bliżej cały cykl rozwojowy *Rhizobium* wewnątrz brodawki, aż do zupełnej utraty błony komórkowej u bakteroidów i do zupełnego ich rozpuszczenia.

Sądzimy, że badania komórek *Rhizobium* po przekształceniu ich w nieobłonione protoplasty będą mogły nam dopomóc do bliższego poznania budowy bakteroidów oraz ich funkcji fizjologicznych. Badania takie rozpoczęła Żelazna, która zreferuje nam dzisiaj wstępne ich wyniki.

Wpływ roślinnego partnera na przemiany budowy komórek *Rhizobium* w naroślach korzeniowych ma być omówiony w referacie Gołębiowskiej. Tutaj wspomnimy tylko o dużym wpływie jąder komórek roślinnych, które, jak wykazał Nutman (1958), warunkują rozwój łańcuszka bakterii po ich wniknięciu do włośników lub wprost do tkanki merystematycznej korzenia.

SKŁAD CHEMICZNY *RHIZOBIUM*

Rizobia zawierają według różnych autorów 4-5% azotu. Według Rippel-Baldesa, Buscha i Radlera (1956) w skład młodych komórek tej bakterii wchodzą spomiędzy aminokwasów głównie: alfa-alanina, arginina, glikokol, leucyna, lizyna i seryna. Badacze ci nie znaleźli w nich kwasów asparaginowego i glutaminowego, które natomiast występują w brodawkach korzeniowych i w formach inwolucyjnych — bakteroidach. Bakteroidy zawierają też, wg nich, więcej cyklicznych aminokwasów niż normalne komórki *Rhizobium*. Jednak Jordan (1953) stwierdził zdolność zarówno aktywnych jak pasożytniczych szczepów *Rhizobium* do wytwarzania kwasu glutaminowego z alfa-ketoglutarowego w obecności donatorów grupy $—NH_2$. Potwierdzałoby to znaną teorię wiązania wolnego azotu skonstruowaną przez Wilsona i Burrisa (1953).

Analizami chemicznymi drobnoustrojów zajmuje się na wielką skalę amerykańska Northern Utilisation Research and Development Division. Przeprowadza się je ze względu na poszukiwanie wśród drobnoustrojów takich, które można by dodawać do produktów żywnościowych dla uzupełnienia diety białkowej. Zbadane między innymi przez Andersona i współpracowników (1958) *Rhizobium sp.* zawierało na 16 g azotu ogólnego 5-8 g lizyny, 2,2 g metioniny i mniejsze ilości (0,4 g) tryptofanu.

Z tych kilku przykładów widzimy, że skład aminokwasowy komórek *Rhizobium* bywa różny, co wynika zapewne z różnic między badanymi

szczepami i z różnych stadiów ich rozwoju w chwili wykonywania analiz przez poszczególnych badaczy.

Thornthon i inni zwrócili uwagę na wytwarzanie dużych ilości lipidów przez starzejące się komórki *Rhizobium*. Thornton i Gangulee (1926), a w ślad za nimi Dubos (1945) sądzą, że charakterystyczne prążkowanie komórek wynika z tego, że kuleczki tłuszczu wypierają z części komórek chromatynę, która zbija się w prążkowate utwory. Wg Bisseta jednak mamy tu przede wszystkim do czynienia z podziałem laseczki na drobne komórki (por. jego cykl rozwojowy *Rhizobium*).

Jak już wspomniano, ogólnie znaną właściwością *Rhizobium* jest wytwarzanie dużych ilości śluzu, złożonego z wielocukrów. Demolon (1951) uważa ten śluz za produkt niezupełnego utlenienia substancji energetycznych. Leizaola i Denonder (1955) stwierdzili, że skład chemiczny śluzów jest cechą grupową *Rhizobium*. Na przykład śluz wytwarzany przez bakterie soi składa się po hydrolizie, z określonych proporcji glikozy, galaktozy, ramnozy i mannozy. W innych mamy głównie pentozany i kwasy uronowe.

POTRZEBY POKARMOWE *RHIZOBIUM*

Z nowszych badań nad odżywianiem się *Rhizobium* możemy zacytować prace Jordana i San Clemente (1955). Odmyte komórki tych bakterii dla rozpoczęcia swego wzrostu potrzebują, wg tych badaczy, aminokwasów. Sole amonowe nie mogą im wówczas zastąpić grupy aminowej. Wzrost zapoczątkowują między innymi cysteina i metionina (Jordan 1952a). Aminokwasy wzmagałyby na ogół oddychanie i początkowy wzrost *Rhizobium*.

Stwierdzono, że w obecności donatorów $—NH_2$ i kwasu ketoglutarowego, mogły wytwarzać kwas glutaminowy zarówno aktywne jak i pasożytnicze szczepy *Rhizobium*. Po rozpoczęciu wzrostu bakterie te mogą zacząć pobierać sole amonowe lub azotany. Wiązanie NH_4^+ zachodziło przy tym zapewne z pomocą dehydrogenazy kwasu glutaminowego i następowały procesy transaminacji z pomocą swoistych transaminaz.

Niektóre wolne aminokwasy, jak zhydrolizowany glikokol lub d-leucyna, mogą następnie hamować rozwój bakterii, które już skompletowały potrzebne im aminokwasy.

Pod względem zdolności syntetyzowania różnych witamin i ciał wzrostowych zaznaczają się duże różnice grupowe. Według zapotrzebowania na biotynę podzielono omawiane bakterie na 3 grupy, z których najwrażliwsze na brak tego składnika szczepy *Rh. trifolii* mogą być używane nawet jako wskaźniki ilości biotyny w środowisku. Bakterie koniczyny zawierają natomiast specjalnie dużo witaminy B_1.

Według Jordana (1952 i 1955), pod względem zdolności syntetyzowania niektórych aminokwasów (kwasu glutaminowego, alaniny) i witamin, wyróżniają się bakterie lucerny. Nie potrzeba im dodawać w pożywce 15 witamin, a wg Burton i Lochheada (1956) oraz Dudy (1958) i innych mogą one syntetyzować specjalnie dużo witaminy B_{12}.

Ładne opracowania monograficzne Demolona (1951). Allenów (1958) i innych opisują całokształt zapotrzebowań hodowlanych różnych grup *Rhizobium*, więc materiałów energetycznych, makro- i mikroelementów i innych składników. Przypominamy tu pracę Georgiego i Wilsona (1933), którzy stwierdzili u *Rhizobium* przemienianie z pomocą enzymów konstytucyjnych materiału oddechowego w postaci glikozy — w 60-80 procentach. na dwutlenek węgla, przy zużyciu pozostałego węgla na budowę komórek i na produkcję śluzu.

Sluzy wytwarzane w specjalnie dużych ilościach przez *Rh. trifolii* i przez inne szybko rosnące grupy stanowią, być może, rodzaj bariery przeciwko niekorzystnym warunkom środowiska oraz zapasy materiału energetycznego.

Harris (1954) badał oddychanie różnych grup bakterii symbiotycznych używając mikrorespiratora. Znalazł on wzmaganie się zdolności utleniania glikozy przy powiększaniu stężenia CO_2 w środowisku nawet do 0,8%. Rizobia mając w zwykłych warunkach hodowlanych duże potrzeby tlenowe, znoszą jednak zmniejszanie się cząstkowego ciśnienia tlenu nawet do 0,01 atmosfery. W brodawkach korzeniowych, gdzie ciśnienie tlenu jest zredukowane, procesy oksydoredukcyjne są zapewne regulowane przez czerwony pigment oraz przez niektóre aminokwasy (Wilson i Burris 1953). Będzie to bliżej omawiane w referatach poświęconych współżyciu bakterii z roślinami i procesom wiązania wolnego azotu.

ROZRÓŻNIANIE SZCZEPÓW AKTYWNYCH I PASOŻYTNICZYCH

Zabieg szczepienia roślin motylkowych ich symbiotycznymi bakteriami jest dzisiaj stosowany powszechnie w celu podwyższania ilości i jakości plonów. Dobór szczepionek odpowiednich dla danej rośliny i odpowiadających dwu głównym warunkom: zdolności zakażania roślin i wywoływania tworzenia się na nich brodawek korzeniowych (wirulencja, „infectivité") oraz dużym uzdolnieniem do wiązania wolnego azotu w tych utworach, czyli aktywności *Rhizobium* (zwanej też „effectivité", „effectiveness") — dobór ten jest sprawą pierwszorzędnej wagi dla otrzymania skutecznie działających szczepionek.

Potrzebne do tego badania genetyczne zarówno bakterii jak ich roślinnych partnerów i selekcja dobrych szczepów wymagają poznania cech sprzężonych z wartością symbiotyczną roślin i szczepów macierzystych

bakterii, służących do wyrobu szczepionek. Obok już wymienionych cech fizjologicznych, biochemicznych i hodowlanych bada się nadal poszczególne szczepy pod kątem widzenia ich aktywności i wirulencji.

A więc np. Georgi i Beguin (1939) oznaczali zdolność do wytwarzania heteroauksyny z tryptofanu ze względu na to, że jest to substancja odgrywająca dużą rolę przy zakażaniu włośników korzeniowych. Autorzy ci nie stwierdzili jednak pod tym względem różnic między „dobrymi" i „złymi" szczepami.

Burton i Lochhead (1952) nie znaleźli współzależności między zdolnością do wytwarzania kobalaminy i aktywnością szczepów.

Seeger (1955) próbował oznaczać stopień aktywności szczepów z pomocą określania natężenia procesów oksydoredukcyjnych w ich hodowlach. Mimo znacznych różnic szczepowych nie otrzymał wyników dostatecznie charakteryzujących szczepy aktywne.

Natomiast Jakowlewa (1957) stwierdziła, przy oznaczaniu potencjału elektroforezy w brodawkach korzeniowych, a więc już podczas stadium symbiotycznego bakterii, że niski punkt izoelektryczny w brodawce koreluje z silnym oddychaniem i energicznym wiązaniem azotu. Byłby to więc ważny wskaźnik stopnia aktywności symbiotycznej. Podobne badania prowadzi u nas Wróbel.

Wieringa i Bakhuis (1957) podali równie ciekawą metodę oznaczania wartości szczepionek *Rhizobium* na podstawie analizy chromatograficznej składu aminokwasowego w soku zaszczepionych nimi roślin. W chromatogramach soku z nieaktywnych brodawek znaleźli tylko kwas asparaginowy, podczas gdy w soku roślin podlegających aktywnej symbiozie wykryto nadto: asparaginę, glutaminę, hydroksyprolinę, treoninę i inne.

Wreszcie Wintika (1957) poszukuje wskaźników wartości szczepów w postaci ich oporności na różne stężenia antybiotyków oraz na działanie promieniowców. Najbardziej oporne na penicylinę są wg niego bakterie sci. Penicylina może nawet działać dodatnio na aktywne szczepy *Rh. japonicum*. *Rh. meliloti* znosi dość duże stężenia penicyliny i jeszcze większe streptomycyny. *Rh. trifolii* jest pod tym względem mniej oporne, ale istnieją tu duże różnice szczepowe.

Wintika sądzi na podstawie swoich wyników, że będzie można z pomocą antybiotyków oczyszczać aktywne hodowle od mniej aktywnych domieszek. Podobną rolę spełniałaby jakoby hodowla z udziałem promieniowców.

Przy sposobności warto zwrócić uwagę na wstępne wyniki badań Żelaznej, która wykazała trudność otrzymywania protoplastów penicylinowych z niektórych grup *Rhizobium*, co częściowo może wynikać z tego,

że mają one zdolności do wytwarzania enzymu adaptacyjnego — penicylinazy. Być może, iż zdolność ta jest cechą nie tylko szczepową, lecz także gatunkową tych bakterii.

WPŁYW BAKTERIOFAGÓW

Nie poruszyliśmy dotychczas tego ważnego czynnika, warunkującego stan aktywności szczepów bakterii i wpływającego na ich populacje w różnych środowiskach.

W referacie poświęconym genetyce *Rhizobium* zamierza Lorkiewicz opowiedzieć nam bliżej o pracach Kleczkowskiej (1950) nad powstawaniem mutantów u *Rh. trifolii* pod wpływem zadania ich hodowli fagiem. Mutanty bakterii koniczyny, otrzymywane jako wtórny wzrost w hodowli, w której ogół bakterii uległ rozpuszczeniu, są zwykle pigmentowane, o wzroście typu *R*, przy czym ich zdolność do wiązania azotu w symbiozie z rośliną spada, co pozostaje cechą utrwaloną. Otrzymujemy więc szczepy nieaktywne, czasem pozbawione nadto wirulencji.

Pracownia Kleczkowskiej zajmuje się też poszukiwaniem fagów w glebie i w roślinach oraz zastosowaniem ich do typowania bakterii. Zachodzi bowiem pytanie, jak dalece mogą być fagi odpowiedzialne za powstawanie nie tylko w hodowlach sztucznych, ale także w warunkach naturalnych nowych, nieaktywnych szczepów *Rhizobium*. Nutman i Kleczkowska (1958) stwierdzają wielką zmienność bakterii koniczyny. Nazywają to nawet „ustawicznymi mutacjami" („constant mutations"), przypisując to zjawisko w dużym stopniu wpływowi różnych rodów roślinnego partnera.

Należy pamiętać o tym, że gleba ma silne własności sorpcyjne i że zapewne unieczynnia ona znaczne ilości fagów, czego nie notujemy w hodowlach płynnych.

Wrażliwość różnych szczepów na fagi jest bardzo rozmaita i zależna od różnych warunków. Wg Kleczkowskiej szczepy bakterii koniczyny, gdy są wirulentne, ulegają też lizie, a brak wirulencji sprzęga się z brakiem lizy. Parker i Allen (1954) wyodrębnili kilka szczepów fagów *Rh. meliloti*. Okazało się, że żaden z nich nie wywoływał lizy u wszystkich zbadanych szczepów tych bakterii. W badaniach rozszerzonych na wszystkie grupy bakterii symbiotycznych stwierdzili oni również swoistą wrażliwość lub oporność na fagi.

U nas Kowalski i Staniewski rozpoczęli badania poświęcone typowaniu *Rhizobium* z pomocą fagów. Znaleźli oni pewne pokrewieństwa pod względem wrażliwości na fagi u szczepów bakterii koniczyny i grochu. Sprawy te przedstawią w swoim referacie. Warto zaznaczyć, że Drożańska znalazła pokrewieństwa budowy antygenowej również u tych samych szczepów *Rh. trifolii* i *Rh. leguminosarum*.

Różni autorzy (Demolon, Thornton, 1954, Allenowie, Wilson i inni) przekonali się niejednokrotnie, że siedliskiem fagów mogą być starzejące się brodawki korzeniowe lub gleby „zmęczone" kilkuletnią uprawą danej rośliny motylkowej na jednym miejscu. Pod tym względem jednak zdania są różne. Na przykład Kleczkowska (1957) znajduje w glebach wykoniczynionych te same ilości fagów, co w glebach zdrowych. W starych glebach koniczynowych populacje *Rh. trifolii* składały się w około 50% ze szczepów opornych na fagi.

Doświadczenia polowe ze szczepieniem roślin szczepami w różnym stopniu opornymi na fagi nie dały dotychczas odpowiedzi na pytanie, jaki wpływ mogą mieć fagi na przeżywanie w glebie szczepów dobrze wiążących wolny azot. Ekologiczny wpływ fagów na stosunki między rośliną i jej bakteriami pozostaje jeszcze niewyjaśniony.

WPŁYW INNYCH DROBNOUSTROJÓW NA BAKTERIE ROŚLIN MOTYLKOWYCH

Z dziedziny wpływu innych drobnoustrojów i produktów ich przemiany materii (oprócz wspomnianego już oddziaływania antybiotyków) zacytujemy przede wszystkim badania Krasilnikowa i Koreniako (1944) poświęcone oddziaływaniu na hodowle *Rhizobium* różnych drobnoustrojów — „aktywatorów" lub „inhibitorów" ich wzrostu. Na podstawie tych badań propagowane jest użycie dla roślin motylkowych szczepionek kombinowanych. Lorkiewicz opowie też zapewne o wywoływanych przez tych badaczy transformacjach poszczególnych gatunków *Rhizobium* pod wpływem wyciągów z innych bakterii.

Dorn (1956) zbadała wpływ różnych grzybów pasożytniczych na rozwój i zdolność zakażania roślin przez rizobia. Stwierdziła przy tym, że np. *Helminthosporium graminis* działa dodatnio na bakterie lucerny, podczas gdy hamują je *Fusarium lini, Penicillium sp.* i różne inne gatunki grzybów, które hamują też rozwój bakterii koniczyny i grochu.

Te i inne badania nad oddziaływaniem na *Rhizobium* różnych drobnoustrojów glebowych, saprofitycznych lub pasożytniczych mogą mieć duże znaczenie dla bliższego poznania warunków, od których zależy rozprzestrzenienie w glebie i na roślinach aktywnych i nieaktywnych ras tych bakterii symbiotycznych. Rozpatrywanie wpływu innych czynników ekologicznych, jak rodzaj gleby, zasobność jej w różne pokarmy, stanowisko w płodozmianie itp. wykracza już poza obręb niniejszego referatu.

LITERATURA

Allen E. A., Allen O. N., 1950: Biochemical and symbiotic properties of *Rhizobia*. *Bact. Rev.*, **14**: 273.

Allen E. A., Allen O. N., 1958: Biological aspects of symbiotic nitrogen fixation. *Handbuch der Pfl. physiol.* Ruhland, **8**: 48. Springer, Berlin.

Anderson R. F., 1958. Lysine, methionine and tryptophane content of microorganisms. *J. Bact.*, **76:** 131.

Bazarewski S., 1927: Badania nad bakteroidami. *Roczn. Nauk. Roln.*, **17:** 1.

Bazarewski J., 1929: Wpływ kofeiny na wiązanie wolnego azotu przez bakterie brodawkowe. *Roczn. Nauk. Roln.*, **21:** 473.

Beijerinck M. W., 1888: Die Bakterien d. Papilionaceen-Knöllchen. *Botan. Ztg.*, **46:** 725, 741, 757, 781, 797.

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 1948, 6 wyd., Williams and Wilkins, Baltimore.

Bergersen S. J., 1955: The cytology of bacteroids from root-nodules of subterranean clover (*Trif. subterraneum* L.). *J. gen. Microbiol.*, **13:** 411.

Białosuknia W., Klott C., 1923: Badania nad *Bacterium radicicola*. *Roczn. Nauk Roln.*, **9:** 288.

Bisset K. A., Hale C. M. F., 1951: The production of swarmers in *Rhizobium sp. J. gen. Microbiol.*, **5:** 592.

Bisset K. A., 1950: The cytology and life history of bacteria. Edinburgh.

Bisset K. A., 1952: Complete and reduced life cycle of *Rhizobium*. *J. gen. Microbiol.*, **7:** 233.

Bisset K. A., 1956: Evidence from the cytology of *Azotobacter chroococcum* of a relationship with *Rhizobium* and the *Bacillaceae*, *J. gen. Microbiol.*, **13:** 442.

Bond G., MacConnell J. T., MacCallum A. H., 1956: *Ann. Bot. N. S.*, **20:** 501 (wg Parker C. A., 1957, l. c.).

Bonnier Ch., 1953: Classification et specifité de l'hôte dans le genre *Rhizobium*. *C. R. VI Int. Congr. Microbiol.*, Rzym, **3:** 109.

Burton M. O., Lochhead A. G., 1952: Production of vitamin B_{12} by *Rhizobium sp. Canad. J. Botan.*, **80:** 521.

Demolon A., 1951: Contrib. à l'étude de la symbiose bactérienne chez les Légumineuses. *Rev. Gen. Botan.*, **58:** 487, 533 i 657.

Dorn M., 1956: Über d. Einfluss phytopathogener Pilze auf d. Entwicklung u. Infektionskraft v. drei Rhizobien-Arten, *Zentr Bakter.*, II **109:** 120.

Dubos R., 1945: The bacterial cell. Oxford Univ. Press.

Duda J., 1958: Wytwarzanie i występowanie kobalamin u bakterii z rodzaju *Rhizobium* (maszynopis).

Georgi C. E., Beguin A. E., 1939: Heteroauxin production by efficient and inefficient strains of rhizobia. *Nature*, **143:** 25.

Georgi C. E., Wilson P. W., 1933: The influence of the tension of oxygen in the respiration of rhizobia. *Arch. Mikrobiol.*, **4:** 543.

Harris J. O., 1954: The influence of CO_2 on oxygen uptake by "resting cells" of bacteria. *J. Bact.*, **67:** 476.

Heumann W., 1952 a: Über d. Wesen u. Bedeutung d. Bakteroide in d. Wurzelknöllchen der Erbse. *Naturwissenschaften*, **39:** 66.

Heumann W., 1952 b: Die asymbiontische Stickstoffbindung d. *Rh. leguminosarum* (*Pisum*) auf Blutnährboden. *Naturwissenschaften*, **39:** 239.

Jakowlewa Z. M., 1957: Sostojanije klubienkowych baktierij w usłowijach simbioza i fiksaciji molekularnogo azota. *Izw. Akad. Nauk SSSR, Ser. Biol.*, 241.

Jensen H. L., 1952: The coryneform bacteria. Biochemical a. symbiotic properties of the *Rhizobia*. *Ann. Rev. Microbiol.*, **6:** 77.

Jordan D. C., 1952: Studies on the legume root-nodule bacteria. II i III. *Canad. J. Botany*, **30:** 125, 693.

Jordan D. C., 1953: Transamination in cell free extracts of effective a. parasitic *Rhizobia*. *J. Bact.*, **65**: 220.

Jordan D. C., San Clemente C. L., 1955: The utilisation of purines, pyrimidines and inorganic nitrogen compounds by effective and ineffective strains of *Rh. meliloti*. *Canad. J. Microbiol.*, **1**: 659, 668.

Kleczkowska J., 1950: A study of phage resistant mutants of *Rh. trifolii*. *J. gen. Microbiol.*, **4**: 298.

Kleczkowska J., 1957: A study of the distribution and the effects of bacteriophage of root-nodule bacteria in the soil. *Canad. J. Microbiol.*, **3**: 171.

Kleczkowska J., 1958: dane bezpośrednie od autorki.

Kleczkowski A., Thornton H. G., 1944: A serological study of root-nodule bacteria from pea and clover inoculation groups. *J. Bact.*, **48**: 661.

Kobus J., 1952: Niektóre cechy morfologiczne i fizjologiczne bakterii symbiotycznych roślin motylkowych. *Acta Microbiol. Polon.*, **1**: 132.

Konokotina A. G., 1934: Morfołogiczeskije izmienienija kłubienkowych baktierij w kłubienkach nuta i łupina. **3**: 221.

Krasilnikow N. A., 1945: Priwiwka nowych swojstw wirulentnosti kłubienkowym i niekotorym niekłubienkowym baktierijam. *Mikrobiologija*, **14**: 230.

Krasilnikow N. A., Koreniako A. I., 1944: Wlijanije poczwiennej mikroflory na wirulentnost i aktiwnost kłubienkowych baktierij. *Mikrobiologija*, **13**: 39.

Krasilnikow N. A., 1949: Opriedielitiel Baktierij i Aktinomicetow. Izd. Akad. Nauk SSSR, Moskwa.

Krasilnikow N. A., 1954: O niekletocznych formach u mikroorganizmow. *Usp. Sowr. Biol.*, **37**: 22.

Lawrence J. C., 1955: Filterability of swarmers of *Rhizobium* and *Azotobacter*. *Nature*, **176**: 1033.

Leizaola M., Denonder R., 1955: Etudes de quelques polyosides produits par les souches de *Rhizobium*. *C. R. Acad. Sci., Paris*, **240**: 1825.

Leifson E., Erdman L. W., 1958: Flagellar characteristics of *Rhizobium sp. A. van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.*, **24**: 97.

Nutman P. S., 1956: Influence of the legume in root-nodule symbiosis. *Biolog. Rev.*, **31**: 109.

Nutman P. S., Kleczkowska J., 1958: dane bezpośrednio od autorów.

Norris D. O., 1956: Legumes and the *Rhizobium* symbiosis. *Emp. J. Exp. Agric.*, **24**: 247.

Parker D. T., Allen O. N., 1954: Characterisation of four phages active against *Rh. meliloti*. *Bacter. Proc.* 49.

Parker C. A., 1957: Evolution of N-fixing symbiosis in higher plants. *Nature*, **179**: 593.

Peterson N. W., 1955: Wyraszcziwanije kłubienkowych baktierij w filtratach drugich widow etich baktierij. *Mikrobiologija*, **24**: 275.

Pochon J., Barjac H., 1958: Traité de Microbiologie du Sol. Dunod, Paris.

Pochon J., Manil P., Tchan Y. T., Bonnier Ch., Calvignac M. A., 1950: Etudes sérologiques des *Rhizobium*. Application au problème de la compétition entre les souches. *Ann. Inst. Pasteur*, **79**: 757.

Prażmowski A., 1889: Das Wesen und d. biologische Bedeutung d. Wurzelknöllchen der Erbse. *Bot. Zentr.*, **39**: 356.

Prażmowski A., 1890: Die Wurzelknöllchen der Erbse. *Landw. Versuchst.* Berlin, **37**: 161.

Rippel-Baldes A., Busch G., Radler F., 1956: Über d. Zusammensetzung v. Involutionsformen d. Mikroorganismen. *Arch. Mikrobiol.*, **23**: 423.

Rouatt J. W., Lochhead A. G., 1956: Qualitative studies of soil microorganisms: XIII. Effect of decomposition of various crop plants on the nutritional groups of soil bacteria. *Soil. Sci.*, **8**: 147.

Seeger J., 1955. Essais de différentiation de souches de *Rhizobium* au moyen d'indicateurs d'oxydoréduction. *C. R. Soc. Biol.*, **149**: 202.

Sembrat Z., 1934: Wpływ kofeiny na bakterie brodawkowe. *Acta Soc. Botan. Polon.*, **11**: 333.

Spicher G., 1954: Lebensdauer u. Stickstoffbindung d. Knöllchenbakterien v. Lupine, Serradella u. Klee in Abhängigkeit von ihrer Gestalt. *Zentr. Bakter. II.* **107**: 383.

Stapp C., Knösel D., 1956: Untersuchungen über d. Entwicklungszyklus sternbildender Bakterien. *Zentr. Bakter., II*, **109**: 416.

Stein E. A., 1953: Sierołogiczeskaja charaktieristika kłubienkowych baktierij. *Mikrobiołogija*, **22**: 423.

Thornton H. G., Gangulee N. N., 1926: The life cycle of the nodule organism *B. radicicola* (Beijerinck) in soil and its relation to the infection of the host plant. *Proc. Roy. Soc. Lond., Ser. B*, **99**: 427.

Thornton H. G., 1930: The life cycles of bacteria. *Med. Res. Council*, **1**: 170.

Thornton H. G., Nutman P. S., 1952: *Proc. Roy. Soc., s. B*, **139**: 170 (wg Pochon J., Barjac H., 1958).

Thornton H. G., 1954: The nodule bacteria and their host legumes: some problems that they still present. *Sci. Progress*, **42**: 185.

Vincent J. M., 1949: *Proc. Linn. Soc. N. S. W.*, **74**: 5, 227 (wg Pochon J., Barjac H., 1958).

Vincent J. M., 1954: The root nodule bacteria of pasture legumes. *Proc. Linn. Soc. N. S. W.*, **79**: 1.

Voets J., 1949: Ondersolk over de nucleare struktuur van *Rhizobium*. *Meded. Landbouw. Hoogsch. Gent.*, **14**: 235 (wg Nutmana, 1956).

Wieringa K. T., Bakhuis J. A., 1957: Chromatography as a means of selecting effective strains of *Rhizobia*. *Plant a. Soil.*, **8**: 254.

Wilson J. K., 1944: Over five hundred reasons for abandoning the cross-inoculation groups of the legumes. *Soil Sci.*, **58**: 61.

Wilson J. K., 1945: Leguminous plants and their associated organisms. *Cornell Univ. Agr. Exp. Sta., Mem.* nr 22.

Wilson P. W., Burris R. H., 1953: Biological nitrogen fixation. *Ann. Rev. Microbiol.*, **7**: 415.

Wintika J., 1957: Znaczenije wzaimnosootnoszenija miežду organizmami dla baktierizaciji kłubienkowymi baktierijami. *Za soc. siel.-choz. nauku, ser. A*, **2**: 127.

Ziegler H., 1956: *B. radicicola* im Elektronmikroskop. *Planta*, **48**: 266.

J. Marszewska-Ziemięcka

SOME PROBLEM IN THE CYTOLOGY AND PHYSIOLOGY OF *RHIZOBIUM*

Summary

The author gives a review of recent progress in the cytology and physiology of *Rhizobium*. The review consists of the following chapters: 1) Phylogeny and taxonomy of *Rhizobium*, 2) Characteristics of strains of *Rhizobium* and their serology,

3) The life cycle of *Rhizobium*, 4) Its cytology, 5) Its chemical composition, 6) The nutrition of *Rhizobium*, 7) Active and parasitic strains of *Rhizobium* and their evaluation, 8) The influence of bacteriophage, 9) The influence of other micro-organisms on the development of *Rhizobium*.

DYSKUSJA

A. Drozdowicz

Czy badanie cytologiczne i obserwacje procesu rozmnażania *Rhizobium* przeprowadzone przez Bisseta upoważniają do wyciągania wniosków co do pokrewieństwa między różnymi drobnoustrojami wiążącymi wolny azot? Wydaje się, że Bisset nie dokumentuje dostatecznie swych wniosków.

Co do różnorodności urzęsienia u *Rhizobium*, Erlach podaje, że tylko monotrichalne pałeczki izolowane z komórek grochu miały zdolność zakażania tej rośliny. Peritrichalnie urzęsione tej zdolności nie wykazywały.

A. Mieczyńska

Mówiąc o czynnych i nieczynnych postaciach *Rhizobium* trzeba zaznaczyć, że Virtanen uznał jedynie bakteroidy za formę czynną przy wiązaniu azotu. Bakterie, jeśli są formą niezdolną do wiązania wolnego azotu mają, być może, niepełny system enzymatyczny, bakteroidy natomiast odznaczają się wg Heumanna pełnym systemem.

M. Ruszkowska

Czy Bisset obserwował cykl rozwojowy *Rhizobium* w glebie, czy na pożywkach sztucznych? Zjawisko przekształcania się bakterii w bakteroidy pod wpływem krwi, co wykazał, w swych badaniach Heumann (1952), jest niezmiernie ciekawe. Wskazywałoby to na ważną rolę hemoglobiny w brodawkach korzeniowych.

Odpowiedź autora

Konieczne jest przeprowadzenie badań nad tym, w jakim okresie pałeczki, które przeniknęły do rośliny, stają się najbardziej czynne. Autorzy niemieccy i amerykańscy twierdzą, że wiązanie wolnego azotu zachodzi przed przejściem *Rhizobium* w formę bakteroidalną.

W Australii prowadzi się obecnie badania nad pierwotnymi formami *Rhizobium* i roślin motylkowych, które są tam dostosowane do warunków bardzo ubogich gleb. Badania te mogą nam pomóc do wyświetlenia zagadnienia pokrewieństwa między różnymi gatunkami *Rhizobium*. W jednej z nowszych prac amerykańskich znajdujemy podział *Rhizobium* na dwie grupy, na podstawie rodzaju ich urzęsienia: 1) bakterie o rzęskach subpolarnych, do których należą powoli rosnące szczepy i 2) bakterie o urzęsieniu peritrichalnym, charakterystycznym dla szczepów szybko rosnących (np. bakterie koniczyny, grochu itp.). W pracy tej podano fotografie rzęsek różnych szczepów *Rhizobium*.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1959, 8 : 225—233

Z. Lorkiewicz

Z ZAGADNIEŃ ZMIENNOŚCI I GENETYKI *RHIZOBIUM*

Referat przeglądowy

Z Zakładu Mikrobiologii Ogólnej Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej
w Lublinie

Przed około 70 laty Beijerinck (1888) wyosobnił bakterie brodawkowe z roślin motylkowych. Już w pierwszych swoich doniesieniach holenderski badacz opisał rizobia jako wybitnie pleomorficzne organizmy, które z postaci laseczkowatych mogą przekształcać się w pływki zakażające rośliny motylkowe, a z tych z kolei powstają różnokształtne bakteroidy.

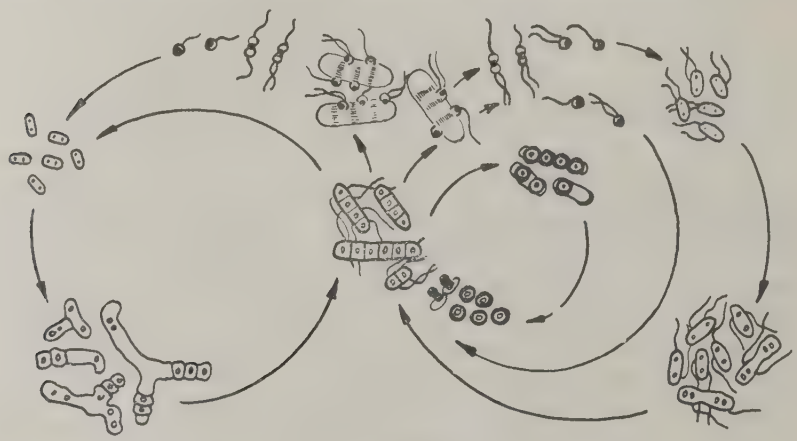
Od dawna usiłowano wykryć prawidłowość rozwoju różnorodnych form bakterii brodawkowych oraz znaleźć związek między budową *Rhizobium* a ich funkcją fizjologiczną. Jakkolwiek w odpowiednich dla nich warunkach hodowlanych rizobia tworzą jednorodną populację, przy zmianie warunków otoczenia drobnoustroje te wykazują rzadko spotykaną u innych bakterii zmienność.

Bewley i Hutchinson (1920) otrzymali na agarze jednorodny wzrost tych bakterii w postaci pałeczek. Zmieniając skład podłoża przez dodanie do niego różnych węglowodanów lub wyciągu glebowego, uczeni ci stwierdzili doświadczalnie możność występowania cyklu rozwojowego u bakterii brodawkowych. W pierwszym stadium, po 4-5 dniach wzrostu na podłożu zawierającym obojętny wyciąg glebowy, otrzymano formy przedpływkowe — drobne, bezrzęskowe postacie ziarniste o średnicy 0,4 μ. W krótkim czasie formy te powiększały się i przechodziły w elipsoidalne, ruchliwe pływki, przenikające przez pory filtru Chamberlanda. Dodatek węglowodanów do podłoża sprzyjał powstawaniu pływek. Następnie z form tych rozwijały się urzęsione pałeczki, które z kolei, w niekorzystnych warunkach pokarmowych, ulegały wakuolizacji i wykazywały charakterystyczne, poprzeczne prążki. Autorzy ci twierdzą, że prążki powstają przez rozpadanie się na segmenty substancji chromatynowej. Po pewnym czasie prążki zaokrąglają się i wydostają na zewnątrz pałeczki jako formy przedpływkowe. Zobaczymy następnie, że wielu badaczy nie

zgadza się z poglądami Bewleya i Hutchinsona co do istoty poprzecznych prążków.

Cyklem rozwojowym u bakterii brodawkowych zajmowali się też szczegółowo Prażmowski (1888-1890), Löhnis z Hansenem (1921), Thornton i Gangulee (1926), Gibson (1928) i ostatnio Bisset (1952).

Zagadnienie powstawania u *Rhizobium* postaci podobnych do bakteroidów w warunkach doświadczalnych pod wpływem różnych czynników, zostało omówione w referacie Ziemięckiej oraz Gołębiowskiej.



Rys. 1. Cykl rozwojowy *Rhizobium* wg Bisseta

Szczególnie interesujący jest cykl rozwojowy tych bakterii w interpretacji Bisseta. Autor ten sądzi, że zdolność wytwarzania zarodników oraz występowanie postaci gramdodatnich świadczy o pokrewieństwie *Rhizobium* z laseczkami, w szczególności z *B. polymyxa*. Rozróżnia on u bakterii brodawkowych pełny i niepełny cykl rozwojowy (rys. 1).

Przy pełnym cyklu (p. rys. 1), który spotyka się u szczepów *Rhizobium*, wyosobnionych z niektórych dzikich roślin i z kwiatowych roślin ogrodowych, bakteroidy są tworami rozgałęzionymi, podzielonymi przegrodami poprzecznymi na segmenty. Czasami po rozpadzie brodawki powstają z nich urzęsione, laseczkowate komórki, barwiące się dodatnio w metodzie Grama. Bisset sądzi, że rizobia w dalszym rozwoju występują w postaci bakterii wielokomórkowych i pojawiające się w nich poprzeczne prążki są błonami oddzielającymi poszczególne komórki tworzące bakterię. Z tych dużych drobnoustrojów wyzwalane są podczas rozpadu pływki. W odróżnieniu od Bewleya i Hutchinsona, którzy sądzili, że pływki powstają z poprzecznych prążków, Bisset i Hale (1951) twierdzą, że postacie

te są wyzwalane z przestrzeni między prążkami. Pływki mogą mieć 1 lub 2 rzęski. Niekiedy zauważa się u nich zjawiska przypominające koniugację. Z „zygot" rozwijają się następnie drobne, urzęsione pałeczki, które zawierają po 2 jądra. Bisset (1951) uważa, ze z laseczkowatych komórek oprócz pływek mogą powstawać także zarodniki. Jednak stwierdził on tutaj pewne różnice w porównaniu z rozwojem postaci przetrwalnikowych u typowych laseczek. Według tego badacza, w każdej z kilku komórek składowych *Rhizobium* może powstać zarodnik, podczas gdy u laseczek z jednego wielokomórkowego tworu powstaje tylko jedna endospora.

Bisset stwierdził, że zarodniki *Rhizobium lupini* są oporne na podgrzewanie do 80° w ciągu 30 minut i na następne gotowanie ich przez 5 minut. Z podgrzanych przez niego w ten sposób zarodników, wysianych potem na odpowiednie podłoże wyrastały po dłuższym czasie kolonie wytwarzające pomarańczowy barwik. Po 2-3 przesiewach kolonie te przybierały jednak normalną szarą barwę.

Jakkolwiek większość badaczy uważa, że bakterie brodawkowe nie wytwarzają zarodników, to jednak stwierdzono nie tylko dużą wytrzymałość *Rhizobium* na podgrzewanie, ale również długotrwałą ich przeżywalność w różnych warunkach. Edwards (1923), Stapp (1924) i Jones (1927) wykazali, że bakterie brodawkowe nie giną w ciągu kilkunastu lat na podłożu z węglem drzewnym lub na podłożu Ashbyego.

Niepełny cykl rozwojowy występuje wg Bisseta u różnych szczepów bakterii brodawkowych grochu lub koniczyny. W odróżnieniu od rozgałęzionych segmentowanych bakteroidów przy cyklu kompletnym, u tych drobnoustrojów bakteroidy są jednokomórkowe, lub składają się z jednej dużej i kilku drobnych komórek. W normalnej hodowli stwierdzano zazwyczaj występowanie drobnych pałeczek. Cykl ten znamionowałyby cechy degeneracyjne oraz brak postaci laseczkowatych.

Dzięki drobnym rozmiarom pływki mogą przechodzić przez filtry bakteriologiczne. Do badań nad przesączalnością bakterii brodawkowych używano sączków kolodionowych, szklanych, Chamberlanda lub Berkefelda (Bewley i Hutchinson 1920, Izrailski i Leonowicz 1933, Almon i Baldwin 1953, Izrailski 1954, Lawrence 1955, Peterson 1955). Niektórzy badacze stwierdzili, że postacie przesączalne *Rhizobium* nie powodują wytwarzania brodawek u roślin motylkowych i że czasami tylko mogą dawać wzrost normalny na specjalnych podłożach. Izrailski (1954) oraz Peterson (1955) otrzymywali z przesączu hodowli bakterii brodawkowych rozwój kolonii w pobliżu innych gatunków *Rhizobium*, odgrywających rolę „karmicieli".

Z powyższym zagadnieniem związane są doświadczenia Krasilnikowa (1955), który badał wpływ przesączu hodowli bakterii brodawko-

wych koniczyny i lucerny na *Rhizobium* nie współżyjące z tymi roślinami. Po kilku miesiącach stwierdzono nabycie nowej cechy — wytwarzanie brodawek na nowym gatunku roślin. Hodując w przesączu bakterii brodawkowych 91 szczepów różnych bakterii Krasilnikow stwierdził, że tylko *Pseudomonas liquefaciens* i *Pseudomonas mycophaga,* nabyły zdolności wytwarzania brodawek; Rubieńczyk (wg Krasilnikowa 1955) otrzymał podobne wyniki.

Wydaje się nam jednak, że Petersen słusznie kwestionuje wyniki Krasilnikowa, wskazując na fakt, że przez filtry Berkefelda i Chamberlanda, których użył Krasilnikow, mogły przejść postacie przesączalne bakterii koniczyny i lucerny, które zregenerowały się w obecności szczepów „karmicieli". Przeciwko interpretacji Krasilnikowa przemawiają również ujemne wyniki badań Izrailskiego (1954), który powtórzył jego doświadczenia, skracając jedynie okres wspólnej hodowli do 2 miesięcy. Petersenowi udało się wyhodować postacie przesączalne ze starych hodowli na podłożu zawierającym *RNA* lub *DNA* i autolizat drożdżowy. Otrzymana hodowla była zbliżona do wyjściowej, przy czym zwykle awirulentna i nieaktywna biochemicznie.

Wyniki Krasilnikowa można również tłumaczyć jako proces transformacji. Do niedawna zjawiska transformacji otrzymywano zaledwie u kilku gatunków bakterii: u *Pneumococcus* (Avery i współpracownicy 1944), *E. coli, H. influenzae, Shigella paradesynteriae* (Braun 1953). W ostatnich latach ukazały się doniesienia Coreya i Starra (1957a i b) o transformacji oporności na streptomycynę i kształtu kolonii u *Xanthomonas phaseoli* oraz Brauna (1957), który użył do swoich doświadczeń pałeczki *Brucella.* Bracco i współpracownicy (1957) oraz Pakuła i współpracownicy (1958) przeprowadzili transformację pomiędzy odrębnymi gatunkami drobnoustrojów.

Interesujące są pomyślne wyniki Balassy (1954, 1955, 1957a i b, 1958), dotyczące transformacji u *Rhizobium.* Uczona ta zastosowała do swoich badań różne gatunki *Rhizobium.* Oprócz użycia zmodyfikowanej metody Ephrussi-Taylor oraz metody Hotchkissa, rozbijała ona komórki przy zastosowaniu ultradźwięków. Balassa przeprowadzała doświadczenia swoje *in vitro* i *in vivo.* Jako cechy znakowane używała oporności na streptomecynę, zdolności wytwarzania brodawek na roślinach niewrażliwych, wytwarzania antygenów i kolonii o określonym kształcie oraz syntetyzowania niektórych aminokwasów, jak cysteiny, izoleucyny lub waliny. Po jednorazowej transformacji otrzymywano stosunkowo niski wzrost oporności na streptomycynę. Dopiero po kilku kolejnych transformacjach otrzymywano znaczniejszy wzrost oporności. Poza tym autorka potwierdziła liczne poprzednie doniesienia innych badaczy, że czynnik transformujący jest rozkładany przez dezoksyrybonukleazę, czyli że jest

zbudowany z kwasu dezoksyrybonukleinowego (*DNA*). *DNA* z *Rh. meliloti* powodował u *Rh. japonicum* powstawanie osobników wywołujących tworzenie się aktywnych brodawek na lucernie, zaś u jednego z przebadanych szczepów *Rh. lupini* otrzymano w tych warunkach opóźnione i nieaktywne brodawki.

W procesie transformacji wykazano 2 stadia. Pierwsze stadium polega na adsorpcji *DNA* na komórkach biorcy, przy czym proces ten ma charakter fizyczny i może zachodzić nawet w płynie buforowym. Do wystąpienia drugiej fazy transformacji konieczne jest bogate w odżywcze składniki podłoże bakteriologiczne. W przeciwnym razie u drobnoustrojów nie rozwinie się cecha przekazywana im za pośrednictwem *DNA*. Dokonywanie transformacji u bakterii brodawkowych stwarza nowe możliwości otrzymywania szczepów o pożądanych cechach, przede wszystkim o szerokim spektrum działania, wysokiej wirulencji i zdolności wiązania azotu. Jest to szczególnie ważne przy produkcji szczepionek bakteryjnych dla roślin motylkowych.

Do niedawna przeważał jeszcze w mikrobiologii pogląd, że bakterie nie mogą rozmnażać się w sposób płciowy. Oprócz obszernych i nadzwyczaj ważnych badań nad rekombinacjami u *E. coli*, które zapoczątkowali Lederberg i Tatum (1946), na szczególną uwagę zasługują obserwacje i poglądy niektórych uczonych co do natury powstawania form gwiaździstych u bakterii. Pierwsze doniesienia o tym zjawisku były dokonane przez Stappa i Bortelsa (1931), którzy zauważyli występowanie u *Agrobacterium tumefaciens* zbliżanie się bakterii i łączenie się ich ze sobą jednym z biegunów, przy czym powstawała gwiazda. Badacze ci uważali proces ten za zjawisko odpowiadające kopulacji. Stoughton (1929) prześledził mechanizm łączenia się komórek *Phytomonas malveacearum*, a Kunicki-Goldfinger (1950) opisał zjawisko gwiaździstości u *Sporocytophaga*.

W następnych publikacjach Stappa wraz z Knöselem (1956 a, b i c) oprócz postaci gwiaździstych u *Agrobacterium* znajdujemy również opisy podobnych tworów u *Rhizobium*. Najodpowiedniejsze dla otrzymania postaci gwiaździstych były podłoża zawierające rozcieńczony sok marchwi z dodatkiem soli żelaza i manganu. Stosując barwienie metodą Feulgena niemieccy badacze prześledzili w mikroskopach kontrastowo-fazowym i elektronowym proces powstawania gwiazd. Zmiany powstawały zwykle po 2 dniach hodowli przy 26° i utrzymywały się przez pewien czas. Po gwiaździstym złączeniu się bakterii, jądra ich przesuwały się w kierunku środka gwiazdy i po pewnym czasie zlewały się ze sobą. Następnie sympleks powstały z połączonych jąder ulegał podziałowi i poszczególne jego fragmenty wędrowały do komórek tworzących gwiazdę. Przez pewien jeszcze czas, gdy pałeczki zaczynały się dzielić, można było zauważyć

pewną więź między komórkami. Stapp i Knösel przypisują temu zjawisku charakter procesu płciowego i traktują je jako kopulację. Gwiaździste skupienia u bakterii powstawały zazwyczaj pod koniec logarytmicznej fazy wzrostu. Na bogatym podłożu komórki zbliżały się do siebie, ale nie dochodziło do ich połączenia i już po 2 godzinach następował podział komórek i rozpad gwiazdy. Natomiast na ubogim w azot, rozcieńczonym agarze marchwiowym, szczególnie jeśli dodano do niego przesączu hodowli tych samych drobnoustrojów, stwierdzono częstsze występowanie gwiazd i dłuższe ich utrzymywanie się.

Heumann (1955) opisał również powstawanie gwiaździstych skupisk u *Agrobacterium* i *Rhizobium*. Uważa on, że z połączonych ziaren jądrowych powstaje polizygota dzbankowatego kształtu, która jest postacią przetrwalnikową bakterii brodawkowych. W odpowiednich warunkach z szyjki dzbanka polizygoty wyrasta pałeczka mnożąca się przez podział. Cały cykl rozwojowy miałby trwać przy 27° około 8-9 tygodni.

Jednak Stapp i Knösel nie zgadzają się z poglądami Heumanna. Uczeni ci zastosowali szczep nr B_6 *Rhizobium* otrzymany od Heumanna i stwierdzili, że „polizygota" jest skupiskiem śluzu wydzielanego obficie przez pałeczki. Śluz ten ulegał hydrolizie przy zadaniu go 0,1 N HCl.

Z kilku opisanych tutaj badań genetycznych wynika, że *Rhizobium* jest ciekawym obiektem, cechującym się rzadko spotykaną zmiennością. Działając też na bakterie brodawkowe czynnikami fizycznymi, chemicznymi lub bakteriofagami możemy uzyskiwać mniej lub bardziej stałe przemiany ich właściwości.

Krasilnikow (1955) podaje, że działając fagiem na rizobia otrzymał około 40 różnych wariantów. Demolon (1951) wyosobnił szczepy oporne na fagi i porównywał je ze szczepami wrażliwymi. Izrailski (1933) wykazał, że oporne na faga bakterie brodawkowe soi i wyki nie zakażały tych roślin. Również Kleczkowska (1950) stwierdziła występowanie mutantów we wtórnym wzroście po zadziałaniu fagami na *Rhizobium*. Wiele szczepów zatracało przy tym na stałe lub na pewien okres czasu zdolność wiązania azotu. O wiele rzadziej obserwowała autorka odwrotne zjawisko, to znaczy powstawanie z niewiążących wolnego azotu aktywnych szczepów po zadziałaniu fagami. Poza tym zauważono zmianę w wyglądzie kolonii wyrosłych w hodowli wtórnej. Ten zanik zdolności asymilowania azotu przypomina opisaną w ostatnich latach przez Isekiego (1957) i Stockera (1958) oraz innych badaczy konwersję lizogenną. Zjawisko to polega na powstawaniu zmian pod wpływem profaga podczas lizogenizowania bakterii.

W obrębie badań nad zmiennością *Rhizobium* pozostaje jeszcze wiele zagadnień nierozwiązanych. Należą tu między innymi transdukcje i rekombinacje bakterii brodawkowych. Badania te ze względu na dużą

zmienność *Rhizobium* oraz na jego rolę w przyrodzie i gospodarce ludzkiej mają szczególnie doniosłe znaczenie i zasługują na jak największą uwagę i wysiłek badaczy.

LITERATURA

Allen K., Allen O. N., 1958: Biological aspects of symbiotic nitrogen fixation. *Handbuch der Pfl. physiol. Ruhland,* Springer, Berlin, **8:** 48.

Almon L., Baldwin J., 1953: The stability of cultures of *Rhizobium. J. Bact.,* **26:** 229.

Avery O. T., MacLeod C. M., MacCarty M., 1944: Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. *J. Exp. Med.,* **79:** 137.

Balassa R., 1954: Transformationsmechanismen der Rhizobien. *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.,* **2:** 51.

Balassa R., 1955: *In vitro* induzierte Transformationen bei Rhizobien. *Naturwissenschaften,* **42:** 422.

Balassa R., 1957a: Durch Desoxyribonukleinsäuren induzierte Veränderungen bei Rhizobien. *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.,* **4:** 77.

Balassa R., 1957b: Einige Bedingungen der Ausbildung einer durch Desoxyribonukleinosäuren induzierten niedrigen Streptomycinresistenz bei Rhizobien. *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.,* **4:** 85.

Balassa R., 1958: Transformationserscheinungen bei Rhizobien. *Abstracts VII^th Intern. Congress for Microbiology.* Stockholm, 49.

Beijerinck M. W., 1921: Verzemelde Geschriften. II. Delft. Die Bakterien der Papilionaeceen-Knöllchen, 155.

Bewley W. F., Hutchinson H. B., 1920: On the changes through which the nodule organism (*Ps. radicicola*) passes under cultural conditions. *J. Agricult. Sci.,* **10:** 144.

Bisset K. A., 1952: Complete and reduced life cycles in Rhizobia. *J. gen. Microbiol.,* **7:** 233.

Bisset K. A., Hale C. M. F., 1951: The production of swarmers in *Rhizobium sp. J. gen. Microbiol.,* **5:** 592.

Bracco R. M., Krauss M. R., Roe A. S., Mac Leod C. M., 1957 Transformation reactions between pneumococcus and three strains of streptococci. *J. Exp. Med.,* **106:** 247.

Braun W., 1953: Bacterial genetics. Saunders Co., Philadelphia.

Braun W., Whallon J., Phillips J., 1957: A phenol-extracted bacterial desoxyribonucleic acid. *Nature,* **180:** 1356.

Corey R. R., Starr M. P., 1957a: Genetic transformation of colony type in *Xanthomonas phaseoli. J. Bact.,* **74:** 141.

Corey R. R., Starr M. P., 1957b: Genetic transformation of streptomycin resistance in *Xantomonas phaseoli. J. Bact.,* **74:** 146.

Demolon A., 1951: Contribution á l'étude de la symbiose bactérienne chez les légumineuses. *Rev. Gen. Botan.,* **58:** 562.

Iseki S., Kashiwagi K., 1957: Lysogenic conversion and transduction of genetic characters by temperate phage iota in *Salmonella.* I. Lysogenic conversion with regard to somatic antigens in *Salmonella* groups *A, B* and *D.* II. Transduction of genetic characters by phage iota in *Salmonella* groups *A, B,* and *D. Proc. Japan Acad. Sci.,* **33:** 481, 486.

Izrailski W. P., Leonowicz K., 1933: Dissociation bei einigen Bakterienarten. *Zentr. Bakter. II*, **88**: 216.

Izrailski W. P., 1954: Issledowanije izmienienij kłubienkowych baktierii pri rostie ich w filtratach drugich baktierii. *Mikrobiołogija*, **23**: 22.

Kleczkowska J., 1950: A study of phage resistant mutants of *Rhizobium trifolii*. *J. gen. Microbiol.*, **4**: 298.

Krasilnikow N. A., 1955: Inducirowannaja izmiencziwost u baktierii. *Usp. Sowr. Biol.*, **40**: 179.

Kunicki-Goldfinger W., 1950: Budowa i cykl rozwojowy rodzaju *Sporocytophaga*, Stanier. *Ann. UMCS Lublin, Sec. C.*, **4**: 395.

Kunicki-Goldfinger W., 1955: Zagadnienie płci u bakterii. *Kosmos, Ser. A.*, **4**: 365.

Lawrence J. C., 1955. Filterability of the swarmers of *Rhizobium* and *Azotobacter*. *Nature*, **176**: 1033.

Lederberg J., Tatum E. L., 1946: Novel genotypes in mixed cultures of biochemical mutants of bacteria. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **11**: 113.

Lewis J. M., 1938: Cell inclusions and the life cycle of rhizobia. *J. Bact.*, **35**: 573.

Pakuła R., Hulanicka E., Walczak W., 1958: Transformation reactions between streptococci, pneumococci and staphylococci. *Bull. Acad. Pol. Sci. Cl. II*, **6**: 325.

Petersen N. W., 1955: Wyraszczywanie kłubienkowych baktierii w filtratach drugich widow baktierii. *Mikrobiołogija*, **24**: 275.

Prażmowski A., 1889: Das Wesen und die biologische Bedeutung der Wurzelknöllchen der Erbse. *Bot. Zentr.*, **39**: 356.

Prażmowski A., 1890: Die Wurzelknöllchen der Erbse. *Landw. Versuchstat.*, Berlin, **37**: 161.

Stapp C., Bortels H., 1931: Der Pflanzenkrebs und sein Erreger *Pseudomonas tumefaciens* II. Mitteilung. Über den Lebenskreislauf von *Pseudomonas tumefaciens*. *Z. Parasitenkunde*, **4**: 101.

Stapp C., Knösel D., 1956a: Phasenoptisch-cytologische Untersuchungen sternbildender Bakterien. *Zentr. Bakter. II*, **109**: 25 .

Stapp C., Knösel D., 1956b: Fortgeführte Untersuchungen über den Entwicklungscyclus und die Karyologie sternbildender Bakterien. *Zentr. Bakter. II*, **109**: 416.

Stapp C., Knösel D., 1956c: Zur Frage des Vorkommens sogenannter „Polyzygoten" bei sternbildenden Bakterien. *Zentr. Bakter. II*, **109**: 473.

Stocker B. A. D., 1958: Phage conversion in *Salmonella typhimurium*. *Abstracts VII Int., Congr. Microbiol. Stockholm*, 65.

Thornton H. G., Gangulee N., 1926: The life cycle of the nodule organism *Bacillus radicicola* (Beij.) in soil and its relation to the infection of the host plant. *Proc. Roy. Soc. Ser. B.* **99**: 427.

Z. Lorkiewicz

SOME PROBLEMS CONCERNING THE VARIABILITY AND GENETICS OF *RHIZOBIUM*

Summary

A review has been given of the development of investigations concerning the life cycle, the transformations, the formation of star-like forms and the influence of bacteriophages on the mutability of *Rhizobium*.

DYSKUSJA

J. Gołębiowska

Doświadczenie Krasilnikowa nad transformacją *Rhizobium* sprawdzał Izrailski, przy czym zwrócił uwagę na możliwość popełnienia przez Krasilnikowa błędów metodycznych. Zmiany gatunkowe *Rhizobium* wywoływane działaniem przesączy z bakterii innego gatunku można by także tłumaczyć zdolnością regeneracji *Rhizobium* z form przesączalnych. Brodawkowanie roślin można uzyskać także działaniem bodźców chemicznych; np. traktując korzenie lucerny kwasem dezoksyrybonukleinowym uzyskanym z hodowli *Rh. meliloti* otrzymywano na nich brodawki, które jednak nie wiązały wolnego azotu.

N. Balicka

Jak należy rozumiec mechaniczne działanie „karmicieli" w hodowlach *Rhizobium*?

A. Mieczyńska

Z jakimi szczepami *Rhizobium* pod względem aktywności pracowała Balassa?

Odpowiedź autora

Na niedokładność doświadczeń Krasilnikowa zwrócił uwagę również Peterson, który w swoich badaniach uzyskał regenerację postaci przesączalnych *Rhizobium* na podłożach z dodatkiem *DNA*, *RNA* i wyciągu drożdżowego. W dużych populacjach mogą występować mutanty, lecz przy odpowiedniej kontroli można tego uniknąć.

Interesujący mechanizm działania „karmicieli" w hodowlach *Rhizobium* nie został jeszcze dokładnie wyjaśniony. Być może neutralizują one toksyczne działanie podłoża, albo też wytwarzają substancje niezbędne dla wzrostu.

Balassa transformowała nieaktywne szczepy *Rhizobium*, uzyskując z nich szczepy aktywne.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1959, 8 : 235—247

I. Żelazna

PROTOPLASTY I PENICYLINAZA U *RHIZOBIUM*

Z Zakładu Mikrobiologii Ogólnej Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej
w Lublinie

WSTĘP

MECHANIZM POWSTAWANIA I STABILIZATORY PROTOPLASTÓW

Protoplasty bakteryjne powstają w wyniku uszkodzenia błony komórkowej przez czynniki zewnętrzne, jak penicylina (Park i Strominger 1957, Hahn i Ciak 1958), lizozym (Weibull 1956, Colobert 1957, Lederberg 1957) lub też na drodze plazmoptyzy. Tworzenie się protoplastów może też być wynikiem mutacji (Mc Quillen 1956).

Spotykano również protoplasty w środowiskach naturalnych i kulturach laboratoryjnych jako wynik starzenia się hodowli (Jeynes 1957).

Penicylina działa hamująco na syntezę nowej błony komórkowej. Skutek jej działania widoczny jest po upływie 2-3 godzin od chwili zadziałania (Oparin, Gelman i Żukowa 1955, Mc Quillen 1956, Lederberg 1957). W miejscu podziału komórki, a więc tam gdzie błona komórkowa jest najdelikatniejsza i najbardziej wrażliwa na działanie antybiotyku (Lederberg 1957, 1958), następuje dyfuzja protoplazmy z komórki, dając kulisty protoplast. Penicylina inaktywuje prawdopodobnie specyficzny enzym — polimerazę, budującą błonę komórkową.

Oprócz penicyliny czynnikiem, który może wyzwalać protoplasty bakteryjne, jest lizozym. Działanie jego na błony komórkowe polega na depolimeryzacji i hydrolizie mukopolisacharydu złożonego z acetyloaminopolisacharydu (Shugar 1954, Weibull 1956, Warren, Gray i Jurczenko 1957, Hahn i Ciak 1958). Lizozym oddziałuje na wiele gatunków bakterii gramdodatnich.

W związku z działaniem lizozymu, nasuwa się pytanie, czy bakterie

z grupy wiążącej wolny azot, w zasadzie gramujemne, ale w pewnych stadiach swego rozwoju mające cechy gramdodatnich bakterii jak to stwierdził Hale (1957), będą ulegały działaniu tego enzymu.

Podobne działanie do lizozymu posiada enzym lityczny wydobyty z zarodników i komórek zarodnikujących *B. cereus*. Działanie jego odnosi się do bakterii nie wrażliwych na lizozym, co wykazali w swoich doświadczeniach Dark i Strange (1957).

Protoplasty cechują się wielką wrażliwością na ciśnienie osmotyczne środowiska. Właściwość ta została określona jako „osmotyczna kruchość" protoplastu i uważana jest za jego zasadniczą cechę (Weibull 1956, Park i Strominger 1957, Lederberg 1957, Hahn i Ciak 1958).

Aby uchronić tworzące się protoplasty przed hypotonicznym działaniem środowiska stosuje się stabilizatory. Do nich zaliczamy sacharozę w stężeniu 0,1-0,5 M, polietyloglikokol 7,5%, NaCl 0,15-0,5 M, glikozę 0,3 M, rafinozę 0,15 M, trehalozę lub melibiozę, lub też 0,5 M roztwór buforu fosforanowego o *pH* 7,0 odpowiedni dla protoplastów lizozymowych (Oparin, Gelman i Żukowa 1955, Weibull 1956, Kalina 1958). Niezbędne są też jony magnezu. Obecność ich uzasadniona jest, jak to ocenia Weibull (Lederberg 1958), ich reagowaniem z lipidami błony plazmatycznej, co ułatwia przeciwstawianie się hypotonicznemu działaniu środowiska.

W wyniku działania czynników indukujących z każdej komórki powstaje jeden protoplast u bakterii jednokomórkowych, a u wielokomórkowych tworzy się łańcuszek kulek, które zlewają się w jeden protoplast (Kalina 1958).

STRUKTURA PROTOPLASTÓW

Niezależnie od gatunku protoplasty przyjmują kształt kulisty. Rozmiary ich są różne. Szerokość protoplastów przewyższa szerokość bakterii wyjściowych, a ich objętość jest o połowę mniejsza od objętości postaci macierzystych (Weibull 1956). Protoplasty optycznie bardziej ciemne i jednorodne pochodzą z hodowli młodej, jasne i ziarniste — ze starej. Wewnątrz protoplastu obserwuje się ziarnistości złożone z materiałów lipoidowych.

Weibull (1956) wyróżnia dwa rodzaje struktur protoplastów: postacie duże i ziarnistości nazywane formami małymi. Postacie duże składają się z tego samego materiału co komórki bakterii i mają pełny system cytochromowy. Są one często utożsamiane z dużymi ciałami postaci *L*, a nawet są z nimi identyfikowane (Spiegelman, Aronson i Fitz-James 1958). Wykazują one według badań Lederberga (1958) rozproszone wewnątrz ciała jądrowe.

Spiegelman i inni (1958) analizując skład tych ciał jądrowych nadał im nazwę „ciał nuklearnych". Materiał wyzwolony z protoplastu za pomocą trawienia lipazą, pozwala zbadać ciała „nuklearne". Składają się one z kwasu dezoksyrybonukleinowego, rybonukleinowego i z białek w stosunku 1 : 1 : 3.

W skład form małych wchodzą ciała tłuszczowe — kwas hydroksymasłowy (Weibull 1956). Weibull oraz Lederberg (1958) wykryli rzęski przymocowane do protoplastów. Są one identyczne z rzęskami organizmu macierzystego. Protoplasty nie są zdolne do ruchu, co wynika, jak sądzi Stocker (wg Kaliny 1958) nie z braku aktywności rzęsek lecz z nieobecności punktu oparcia.

Mac Quillenowi (1956) udało się zaobserwować i udowodnić wzrost protoplastów oraz początkowe stadia ich podziału.

METABOLIZM PROTOPLASTÓW

Weibull (1956) i Mc Quillen (1956) stwierdzili, że komórki bakterii i ich protoplasty mają jednakowe zdolności endogennego oddychania i że utleniają glikozę w podobny sposób. Świadczy to o tym, że wiele enzymów w protoplastach pozostaje nienaruszonych. Mogą one również tworzyć enzymy adaptacyjne, jak to zaobserwował Wiame (wg Weibulla 1956).

Obie postacie, tj. zarówno protoplasty jak nienaruszone bakterie mają również te same zdolności do syntetyzowania białek i kwasów nukleinowych.

Oparin i współpracownicy (1955) stwierdzili, że zawartość fosforu w kwasach nukleinowych i całego azotu w protoplastach jest tylko nieznacznie niższa niż w normalnych komórkach. Natomiast Chargaff, Schulman i Shapiro (1957) nie zaobserwowali różnic między ilością *DNA* w protoplastach *E. coli* i w komórkach macierzystych.

Badania Parka i Stromingera (1957) oraz Weibulla (1956) mówią o tym, że protoplasty mają błonę półprzepuszczalną, w której zlokalizowana jest osmotyczna bariera komórki. Również wszystkie procesy przemiany materii protoplastów i bakterii odbywają się przy współudziale tej otoczki.

Badania serologiczne różnych serotypów dają aglutynację *O* i *H*, co może być związane z elementami pozostałymi z rozkładu błony komórkowej (Lederberg 1958). O tym świadczą też badania Spizziena (1956), który stwierdził, że protoplasty mogą reagować z niektórymi fagami.

Przeżywalność protoplastów ogranicza się zwykle do 24 godzin (Weibull 1956, Kalina 1958, Lederberg 1958). Wprawdzie w literaturze omawiającej protoplasty spotyka się wzmianki o kilkudniowej

przeżywalności tych postaci, (K a l i n a 1958), jednak brak jest bliższych danych na ten temat.

Protoplasty penicylinowe w nieobecności czynnika indukującego — penicyliny, powracają do postaci wyjściowych (L e d e r b e r g 1957, 1958). Wskazuje to na zdolność odbudowania błony komórkowej po usunięciu czynnika indukującego.

Jako ostatnie zagadnienie pozostaje podobieństwo protoplastów do postaci *L.* L e d e r b e r g (1958), mając na uwadze protoplasty penicylinowe, wyraża pogląd, że postacie *L* — to kolonie protoplastów. W e i b u l l (1956) stawia znak równości między protoplastami i formami *L.* Natomiast L a n d m a n, A l t e n b e r g i G i n o z a (1958) są zdania, że protoplasty to forma pośrednia między bakteriami i postaciami *L.*

ZNACZENIE PROTOPLASTÓW

Badania nad protoplastami umożliwiły poznanie roli warstw powierzchniowych komórki, to jest błony komórkowej i cytoplazmatycznej.

Doświadczenia nad protoplastami otwierają nowe perspektywy dla badań immunologicznych. Przez rozłożenie komórki na jej części składowe będzie można zapewne wyjaśnić związek między jej budową antygenową i strukturami morfologicznymi.

Protoplasty mogą również służyć, jak sądzi L e d e r b e r g (1958), do badań genetycznych.

Spodziewamy się, że uzyskanie protoplastów w formie utrwalonej u *Rhizobium* może pomóc do bliższego poznania zdolności tych bakterii do asymilacji wolnego azotu i współżycia ich z roślinami motylkowymi.

BADANIA WŁASNE

Pierwotnym założeniem tej pracy było uzyskanie protoplastów penicylinowych i lizozymowych z bakterii należących do rodzaju *Rhizobium.*

W toku pracy nad protoplastami penicylinowymi okazało się, że niektóre szczepy nie tylko nie tworzą protoplastów, ale wykazują dużą żywotność w obecności nawet wysokich stężeń penicyliny (3000 j/ml). Nasunęło to pytanie, czy badane bakterie mogą wytwarzać penicylinazę. Stąd powstało drugie zagadnienie — zdolność wytwarzania penicylinazy przez *Rhizobium.*

PROTOPLASTY PENICYLINOWE

M a t e r i a ł i m e t o d y. Przy uzyskiwaniu protoplastów penicylinowych w pierwszym rzędzie zajęto się doborem najodpowiedniejszych warunków dla powstawania protoplastów. Początkowe badania dotyczyły wysokości dawki czynnika indukującego, składu podłoża, stabilizatorów protoplastów, oraz wpływu *pH* środowiska.

Przebadano następujące stężenia penicyliny: 100, 500, 1000, 2000 i 3000 j/ml pożywki. W wyniku tych badań postanowiono stosować stężenia 3000 j/ml, chociaż dla jednego szczepu (*Rhizobium* dla seradeli szczep *Og*) optymalne okazało się stężenie 500 j/ml.

W badaniach nad podłożem uwzględniono następujące środowiska: płyn fizjologiczny, pożywka mineralna Thorntona: 1) z dodatkiem ekstraktu drożdżowego i bez niego, 2) z hydrolizatem kazeiny i z wyciągiem drożdżowym, oraz 3) modyfikacje wymienionych podłoży z dodatkiem 0,5% węgla aktywowanego. Z powyższych podłoży zastosowano do dalszych badań pożywkę mineralną Thorntona z dodatkiem ekstraktu drożdżowego i hydrolizatu kazeiny.

Z przebadanych stabilizatorów takich jak: glikoza 0,5 M, 0,25 M, ramnoza 0,5 M i 0,25 M, sacharoza 0,3 M i 0,6 M, NaCl 5 M, bufor fosforanowy 0,5 M oraz $MgSO_4$ 0,01 M, wybrano 0,3 M sacharozę z równoczesnym dodatkiem $MgSO_4$ w stężeniu 0,01 M.

Stwierdzono, że najodpowiedniejszym jest *pH* bliskie 7,0.

Badania nad protoplastami penicylinowymi przeprowadzono z następującymi szczepami otrzymanymi z Kolekcji Puławskiej:

Rh. leguminosarum — szczepy dla grochu *1, 5* i *222*
Rh. meliloti — szczepy dla lucerny *Thp*
Rh. trifolii — szczepy dla koniczyny *2p*, b_1, *x*, *3p*, *F*, *325a* i *N*
Rh. lupini — szczepy dla seradeli *4p*, *5*, *Og* i *K*
Rh. lupini — szczepy dla łubinu *Cz*, *K* i *359a*.

Rhizobium wysiewano na zmodyfikowaną pożywkę Thorntona i równocześnie dodawano 0,3 M sacharozy i 0,01 M $MgSO_4$. Po 3-18 godzinach wzrostu dodawano penicylinę w stężeniu 3000 j/ml. Zmiany morfologiczne badano w mikroskopie kontrastowo-fazowym. Na podstawie wyników otrzymanych przy zastosowaniu penicyliny w opisanych warunkach podzielono zbadane szczepy *Rhizobium* na cztery grupy:

1. Szczepy wytwarzające 70-80% protoplastów (*Rh. trifolii* — szczep *N*, *Rh. leguminosarum* — szczep 5).

2. Szczepy wytwarzające 40-50% protoplastów (*Rh. leguminosarum* — szczepy *1* i *5* oraz *Rh. lupini* — szczep *359 a*).

3. Szczepy wytwarzające zaledwie 1-15% protoplastów (*Rh. leguminosarum* — szczep *222*, *Rh. lupini* — szczepy *Og*, *K* oraz *Rh. trifolii* — szczepy *2p i F*).

4. Nie wytwarzające wcale protoplastów w tych warunkach (pozostałe).

OBSERWACJE NAD POWSTAWANIEM PROTOPLASTÓW

Po 2 godzinach inkubacji część bakterii zaczynała zmieniać się pod względem morfologicznym. Bakterie obrzmiewały, niektóre wydłużały się, protoplazma wewnątrz komórek zbijała się w grudki i po 5-8 godzi-

nach zawartość komórek wypływała na zewnątrz. Procesy te zachodziły na biegunach komórki. Z innych komórek protoplazma uwalniała się w postaci kulistego protoplastu, ciągnącego za sobą pustą błonę komórkową, lub też można było zobaczyć swobodnie pływające protoplasty. Miały one kształt okrągły, o bardziej lub mniej jednorodnej zawartości, czasami z wakuolą w środku. Obserwowano również wyzwalanie się ziarn z wnętrza komórki bakteryjnej. Przy niektórych protoplastach widać było pojedyncze, drobne ziarenka przymocowane na włóknie.

W czasie jednej doby ilość protoplastów wzrastała, po czym ulegały one wakuolizacji i lizie.

Protoplasty uzyskane z *Rhizobium* koniczyny szczepu *N* w odróżnieniu od innych przetrwały w stanie niezwakuolizowanym przez 7 dni (dłużej protoplastów nie obserwowano). Tak długotrwałego okresu nie stwierdził żaden z cytowanych przez nas autorów.

Nieco inaczej wyglądały protoplasty otrzymane ze szczepów z grochu *1* i *5*. Były to pojedyncze protoplasty lub całe ich zespoły. *Rhizobium leguminosarum* — szczep *222* dla grochu oraz szczepy *K* dla seradeli, dawały protoplasty soczewkowe.

PROTOPLASTY LIZOZYMOWE

Materiał i metody. Lizozym otrzymano według metody Shugara (1954). Za dawkę indukującą przyjęto 100 mcg/ml. Czynnikami stabilizującymi były 0,6 M roztwór sacharozy i 0,01 M $MgSO_4$. W doświadczeniach użyto szczepu *359 Rh. lupini*. Bakterie po trzech godzinach obrzmiewały, po pięciu godzinach były wyraźnie zmienione, niektóre z wyrostkami w postaci „uszu królika" i następnie część z nich dawała kuliste protoplasty. Innych szczepów *Rhizobium* jeszcze nie badano.

Próbowano otrzymać protoplasty przy użyciu aminokwasów (alanina, glicyna, alfa-fenyloalanina). W dotychczasowych próbach nad otrzymaniem protoplastów przy zastosowaniu aminokwasów nie uzyskano wyników dodatnich.

Planowane są dalsze badania zarówno nad protoplastami penicylinowymi, lizozymowymi jak i nad protoplastami przy zastosowaniu aminokwasów.

Należy tu zaznaczyć, że z literatury omawiającej tę dziedzinę znana jest nam jedynie praca Rubio (1958), który otrzymał formy *L* u *Rh. lupini*.

WYTWARZANIE PENICYLINAZY

Jak wiadomo, nie wszystkie bakterie ulegają działaniu penicyliny. Wiele z nich wykazuje oporność na ten antybiotyk. Oporność ta może wynikać ze zdolności wytwarzania penicylinazy.

Materiały i metody. Badania nad powstawaniem penicylinazy przy użyciu 100 j/ml i 1 j/ml jako dawek indukujących przeprowadzono z 40 szczepami *Rhizobium* wymienionymi w tabelach I i II.

Do otrzymania penicylinazy zastosowano metodę podaną przez Kwapińskiego (1958).

Obecność i siłę działania penicylinazy badano, używając nieco zmodyfikowanej metody cylinderkowej, stosowanej do oznaczania aktywności penicyliny (Kuryłowicz 1946).

Na płytki agarowe zasiane *Staphylococcus aureus Oxford P-209* nakładano cylinderki napełnione wyciągiem uzyskanym z badanych rizobii, zmieszanym z następującymi rozcieńczeniami penicyliny: 0,5, 1,0, 2,0, 5,0, 10,0 j/ml. Jako kontrolę aktywności penicyliny stosowano cylinderki napełnione tylko wyżej wymienionymi rozcieńczeniami penicyliny. Badania te robiono w czterech powtórzeniach.

W tabeli I przedstawiono aktywność penicylinazy indukowanej przez 100 j/ml. Numery i symbole w tej tabeli przedstawiają zbadane szczepy *Rhizobium*.

Do dalszych badań nad powstawaniem penicylinazy zastosowano dawkę penicyliny w wysokości 1 j/ml, polecaną przez Pollocka (1953). Badania z 1 j/ml przeprowadzono na 40 szczepach *Rhizobium*, wymienionych w tabeli II.

Do określenia aktywności powstałego w tych warunkach enzymu wybrano następujące stężenia penicyliny: 1,0, 2,0, 5,0, 10,0, 20,0, 50,0 j/ml.

Wyniki obrazujące aktywność penicylinazy indukowanej przez 1 j/ml zebrano w tabeli II.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Na podstawie badań nad wytwarzaniem penicylinazy u różnych szczepów *Rhizobium* stwierdzono, że przy użyciu 100 j/ml penicyliny około połowa, tj. 18 szczepów wytwarzało penicylinazę. W obrębie poszczególnych grup *Rhizobium* aktywność powstającej penicylinazy była bardzo różna (tabela I) i wahała się w granicach do 5 jednostek penicyliny, rozkładanej przez enzym.

Po dodaniu penicyliny w ilości 1 j/ml 24 szczepy: *Rh. leguminosarum, Rh. meliloti, Rh. japonicum, Rh. trifolii* (1 szczep na 8 badanych), *Rhizobium sp.* szczep dla *Arachis, Rhizobium sp.* szczep dla *Anthyllis vulneraria, Rh. lupini* (z seradeli oraz łubinu) wytwarzały penicylinazę, przy czym ilości tego enzymu były większe niż przy działaniu 100 j/ml (tabela II).

Podczas, gdy niektóre szczepy *Rhizobium* nie wytwarzały penicylinazy przy stężeniu penicyliny 100 j/ml, przy zastosowaniu 1 j/ml wytwarzały ten enzym nieraz w dość dużych stężeniach. Stwierdzono to np.

Tabela I

Wytwarzanie penicylinazy przez różne szczepy *Rhizobium* w obecności penicyliny w stężeniu 100 j/ml

Production of penicillinase by different strains of *Rhizobium* in presence of penicillin in concentration of 100 units per ml

Nazwa szczepu Name of strain	Symbole szczepów Symbols of strains				
	Ilość penicyliny w j/ml rozkładanej przez różne szczepy *Rhizobium* Units per ml of penicillin decomposed by different strains				
	0	0,5	1,0	2,0	5,0
Rh. leguminosarum — szczepy dla grochu — for peas	*1, 5* *222*	—	—	—	—
Rh. leguminosarum — szczepy dla bobiku — for horse-bean	*0g, 73*	—	—	—	—
Rh. leguminosarum — szczep dla wyki — for vetch	*6*	—	—	—	—
Rh. meliloti — szczepy dla lucerny — for lucerne	*413a*	*Bp*	*N, 94,* *Ch*	—	*Thp*
Rh. japonicum — szczepy dla soi — for soy-beans	*L*	—	*94p*	—	*101c,* *102c*
Rh. trifolii — szczepy dla koniczyny — for clover	*2p, b_1, b_2* *x,F,325a*	*N*	*3p*	—	—
Rhizobium sp. — szczep dla *Arachis*	—	—	—	*R*	—
Rh. phaseoli — szczepy dla fasoli — for beans	*1, 3*	—	—	—	—
Rhizobium sp. — szczep dla *Anthyllis vulneraria*	—	*P, 74*	—	—	—
Rh. lupini — szczepy dla seradeli — for serradilla	*4p, 0g,* *K, B.*	*6*	*S, P*	—	—
Rh. lupini — szczepy dla łubinu — for lupine	*Cz*	*271,* *359a*	—	*K, R*	—

Tabela II

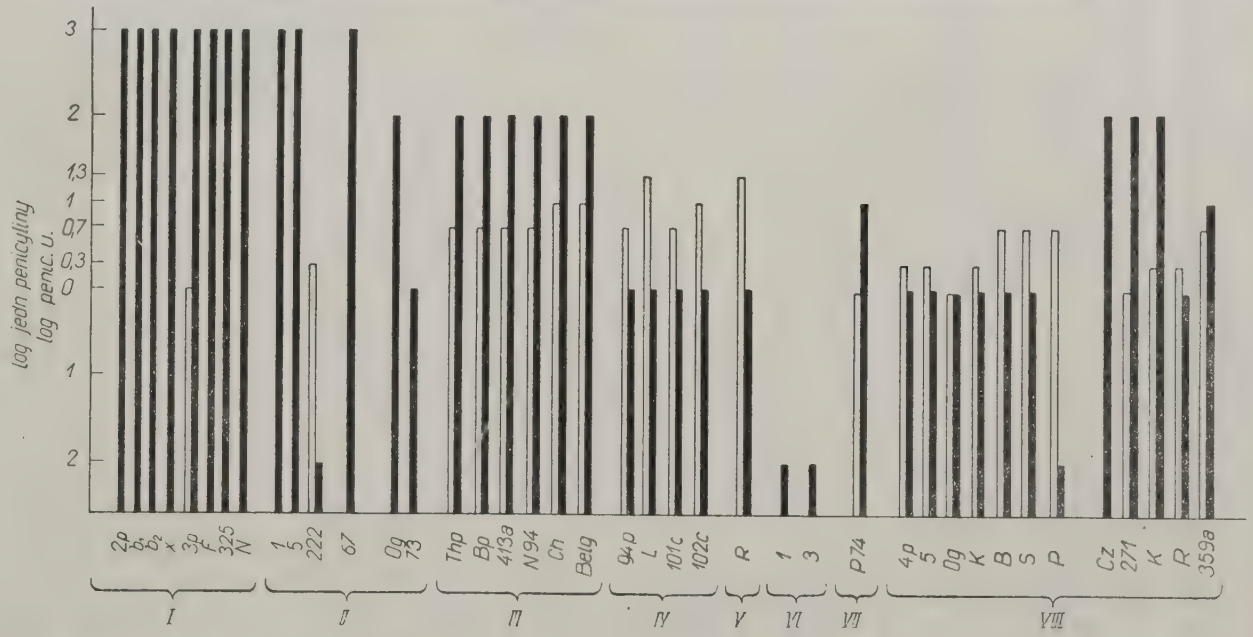
Wytwarzanie penicylinazy przez różne szczepy *Rhizobium* w obecności penicyliny w stężeniu 1 j/ml.

Production of penicillinase by different strains of *Rhizobium* in presence of penicillin in concentration of 1 unit per ml

Nazwa szczepu Name of strain	Symbole szczepów Symbols of strains Ilość penicyliny w j/ml rozkładanej przez różne szczepy *Rhizobium* Units per ml of penicillin decomposed by different strains					
	0	1,0	2,0	5,0	10,0	20,0
Rh. leguminosarum — szczepy dla grochu — for peas	*1,5*	—	*222*	—	—	—
Rh. leguminosarum — szczepy dla bobiku — for horse-bean	*0g, 73*	—	—	—	—	—
Rh. leguminosarum — szczep dla wyki — for vetch	*67*	—	—	—	—	—
Rh. meliloti — szczepy dla lucerny — for lucerne	—	—	—	*N, 94, 413a, Bp, Thp*	*Ch*	*Belg*
Rh. japonicum — szczepy dla soi — for soy-beans	—	—	*94p*	*101c*	*102c*	*L*
Rh. trifolii — szczepy dla koniczyny — for clover	*2p, b_1, b_2, x, F, 325, N*	*3p*	—	—	—	—
Rhizobium sp. — szczep dla *Arachis*	—	—	—	—	—	*R*
Rh. phaseoli — szczepy dla fasoli — for beans	*1, 3*	—	—	—	—	—
Rhizobium sp. — szczep dla *Anthyllis vulneraria*	—	*P. 74*	—	—	—	—
Rh. lupini — szczepy dla seradeli — for serradilla	—	*0g*	*4p, 5, K*	*B, S, P.*	—	—
Rh. lupini — szczepy dla łubinu — for lupine	*Cz*	*271*	*R*	*K, 359a*	—	—

Zdolność różnych szczepów *Rhizobium* do wytwarzania penicylinazy w obecności 1 j/ml oraz oporność na penicylinę

The ability of *Rhizobium* strains to produce penicillinase and their resistance against penicillin



Uwagi — Remarks: *I — Rh. trifolii*; *II — Rh. leguminosarum* (*1, 5, 222* dla grochu — for peas; *67* dla wyki — for vetch; *73, Og* dla bobiku — for horsebean); *III — Rh. meliloti*; *IV — Rh. japonicum*; *V — Rh. sp Arachis*; *VI — Rh. phaseoli*; *VII — Rh. sp. Anthyllis*; *VIII — Rh. lupini* (*4p, 5, Og, K, B, S, P* dla seradeli — for serradilla; *Cz, 271, K,: R. 359a* dla łubinu — for lupine)

inaktywacja penicyliny przez enzym
inactivation of penicillin

oporność na penicylinę
resistance against penicillin

u bakterii lucerny. Szczepy należące do grup: *Rh. leguminosarum* — szczepy dla bobiku oraz wyki i *Rh. phaseoli* — szczepy dla fasoli nie wykazywały obecności penicylinazy przy żadnej z użytych dawek.

Z przeprowadzonych badań nad protoplastami penicylinowymi i nad wytwarzaniem penicylinazy u *Rhizobium* wynika, że szczepy wytwarzające do 80% protoplastów nie produkują penicylinazy (*Rh. leguminosarum* — szczep dla grochu 5) lub wytwarzają ją w nieznacznych ilościach (*Rh. trifolii* — szczep *N*). Niektóre natomiast ze szczepów wyzwalające do 50% protoplastów, są zdolne do produkcji enzymu inaktywującego do 5 j/ml penicyliny (np. *Rh. lupini* — szczep *359 a*).

Procent komórek *Rhizobium*, przechodzących w protoplasty zależy zatem od ilości wytwarzanej penicylinazy, a więc wraz ze zwiększoną zdolnością do wytwarzania enzymu zmniejsza się zdolność bakterii do przechodzenia w protoplasty.

Jako badanie uzupełniające przeprowadzono doświadczenie nad opornością szczepów *Rhizobium* na penicylinę. Próba ta miała na celu wykazanie korelacji między zdolnością do produkcji penicylinazy i opornoscią szczepów *Rhizobium* na ten antybiotyk.

Wyniki dotyczące oporności szczepów i ich zdolności do wytwarzania penicylinazy pod wpływem 1 j/ml zebrano w wykresie. Z wykresu wynika, że szczepy, które są oporne na stężenia penicyliny w granicach 1-100 j/ml, wytwarzają penicylinazę o różnej sile działania (1-20 j/ml). Jednakże szczepy specjalnie oporne (nawet na 1000 j/ml) nie wytwarzają tego enzymu lub produkują bardzo niewielkie jego ilości.

Wydaje się, że wrażliwość na penicylinę jest cechą grupową *Rhizobium*.

WAŻNIEJSZE WNIOSKI

1. Otrzymano protoplasty z bakterii grupy *Rhizobium*, przy czym niektóre ich szczepy wytwarzały protoplasty bardzo trwałe, jak np. *Rhizobium* koniczyny — szczep *N*
2. Indukcja penicyliny przy zastosowaniu 1 j/ml okazała się skuteczniejsza dla otrzymania penicylinazy, niż wyższa dawka antybiotyku, wynosząca 100 j/ml (tab. II)
3. Jakkolwiek zbadano dotychczas tylko niewiele szczepów, należących do poszczególnych grup *Rhizobium*, sądzimy, że zdolność wytwarzania penicylinazy może być cechą grupową. Potrzebne są jednak dalsze badania w tym kierunku
4. Szczepy, które produkują penicylinazę mają zmniejszoną zdolność do przechodzenia w protoplasty
5. Na podstawie przeprowadzonych badań wydaje się nam, że oporność na penicylinę jest u *Rhizobium* właściwością grupową (tab. III).

LITERATURA

Bauman N., Davis B., 1957: Selection of auxotrophic bacterial mutants through diaminopimelic acid or thymine deprival. *Science*, **126**: 170.

Chargaff E., Schulman H. M., Shapiro H. S., 1957: Protoplasts of *E. coli* as sources and acceptors of desoxypentose nucleic acid; rehabilitation of a deficient mutant. *Nature*, **180**: 851.

Colobert L., 1957: Destruction par le lysozyme après delipidation de la paroi éxterne de Salmonelles pathogènes. *C. R. Acad. Sc.*, **245**: 1674.

Dark F. A., Strange R. E., 1957: Bacterial protoplasts from *Bacillus sp.* by the action of autolytic enzymes. *Nature*, **180**: 759.

Hahn F. G., Ciak J., 1958: Penicillin-induced lysis of *Escherichia coli*. *Science*, **125**: 119.

Hale C. M. F., 1958: A note on the relationship between the Gram reaction and plasmolitic effects in bacteria. *Exp. Cell. Res.*, **12**: 657.

Jeynes M. H., 1957: Growth and properties of bacterial protoplasts. *Nature*, **180**: 867.

Kalina G., 1957: Protopłasty baktierii. *Żurnał Mikrob. Epidemiol. Immunol.*, **29**: 136.

Kwapiński J., 1958: Swoiste enzymy przeciwantybiotyczne. *Acta Microbiol., Polon.*, **7**: 181.

Kuryłowicz W., 1946: Penicylina. Wydanie II. Książnica-Atlas, Wrocław—Warszawa.

Landman O. E., Altenbern R. A., Ginoza H. S., 1958: Quantitative conversion of cells and protoplasts of *Proteus mirabilis* and *Escherichia coli* to the *L*-form. *J. Bact.*, **75**: 567.

Lederberg J., 1957: Mechanism of action of penicillin. *J. Bact.*, **73**: 144.

Lederberg J., 1958: Protoplasts and *L*-type growth of *Escherichia coli*. *J. Bact.*, **75**: 143.

McQuillen R., 1956: Capabilities of bacterial protoplasts. *Bact. Anatomy:* 137. Cambridge Univ. Press.

Oparin A. J., Celman N. S., Żukowa J. G., 1955: Wlijanije izmienienija struktury bakterialnych protoplastow na dychanije i wkluczenije mieczeniewo glikokoła. *Dokł. A. N. SSSR.*, **105**: 1036.

Park J. T., Strominger J. L., 1957: Mode of action of penicillin. *Science*, **125**: 99.

Pollock M. R., 1953: Stages in enzyme adaptation. III *Symp. Soc. Gen. Microbiol.:* Cambridge Univ. Press.: 150.

Rubio M., 1958: Modifications in the bacterial cell-wall during the *L*-cycle. *Abstracts VII Internat. Cong. Microbiol.* Stockholm,: 429.

Shugar D., 1954: Lizozym. *Acta Microbiol. Polon.*, **3**: 125.

Spiegelman S. A., Aronson I., Fitz-James P. C., 1958: Isolation and characterization of nuclear bodies from protoplasts of *Bacillus megatherium*. *J. Bact.*, **75**: 102.

Spizzien J., 1956: Infection of protoplasts by disrupted *T2* virus. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **43**: 694.

Warren G. H., Gray J., Jurczenko J. A., 1957: Effect of polymyxin on the lyzis of *Neisseria catarrhalis* by lysozyme. *J. Bact.* **74**: 788.

Weibull C., 1956: Bacterial protoplasts, their formation and characteristics. *Bact. Anatomy*, Cambridge Univ. Press.: 111.

I. Zelazna

PROTOPLASTS AND THE PENICILLINASE OF *RHIZOBIUM*

Summary

Different strains of *Rhizobium* have been studied in respect of their ability to produce: 1) protoplasts (18 strains) and 2) penicillinase (40 strains).

1. Production of protoplasts. The author has studied the influence either of penicillin in hypertonic solutions, of lysozyme or of some aminoacids (alanine, glicyne, α-phenylalanine). Penicillin has been used in concentration of 3000 units/ml together with 0,3 M of sacharose and 0,01 M $MgSO_4$, in which case even 80 p. c. of cells of *Rh. trifolii* (strain *N*), and of *Rh. leguminosarum* for pea (no. 5) have been sometimes transformed in protoplasts. One strain of *Rh. lupini* (nr *359a*) could give protoplasts under the influence of lysozyme. No protoplasts have been obtained in the case of aminoacids used.

2. Penicillinase. In order to induce the formation of the penicillinase penicillin in concentrations 100 and 1 unit per 1 ml of culture (in a modified Thornton's medium) was used. The results (table II) show, that a lower concentration of penicillin (1 unit per 1 ml) induced the production of a more active enzyme, than did the higher one (100 units/ml).

In most cases those strains, which were able to produce penicillinase (*Rh. lupini* for serradilla, *Rh. lupini* for lupine, *Rh. meliloti* for lucerne, *Rh. japonicum* for soybeans, *Rhizobium sp.* for *Arachis* and *Rhizobium sp.* for *Anthyllis vulneraria*) have been resistant against penicillin in concentrations of 1-100 units/ml. Those strains (*Rh. leguminosarum* for peas, for horse-bean and for vetch and *Rh. trifolii* for clover) which did not produce this enzyme or gave it only in weak concentrations, have been — on the contrary — very resistant to the action of penicillin (up to 1000 u. per ml).

DYSKUSJA

A. Strzelczykowa

W badaniach naszych, których celem było poznanie wpływu promieniowców antagonistycznych, na niektóre bakterie glebowe stwierdzono, że badane 2 szczepy *Rhizobium* (*Rh. trifolii* i *Rh. leguminosarum*) są stosunkowo mało wrażliwe na działanie substancji antybiotycznych, wydzielanych przez różne promieniowce.

J. Gołębiowska

W jaki sposób protoplasty mogą ułatwić badania nad warunkami wiązania azotu przez *Rhizobium*?

Odpowiedź autora

Sądzimy, że dopiero uzyskanie protoplastów w formie utrwalonej może pozwolić na porównanie ich działania z działaniem bakteroidów.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1959, 8 : 249—252

D. Drożańska

BUDOWA ANTYGENOWA RÓŻNYCH SZCZEPÓW *RHIZOBIUM*

Doniesienie

Z Zakładu Mikrobiologii Ogólnej Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Do pierwszych prac nad budową antygenową *Rhizobium* należą prace Zipfela (1911), Krügera (1914) i Simona (1914). Autorzy ci nie stwierdzili żadnego pokrewieństwa serologicznego pomiędzy szczepami tego rodzaju bakterii.

Z naszych badaczy Białosuknia i Klott (1923) przebadali dużą ilość szczepów *Rhizobium* spodziewając się, że dokładne poznanie ich budowy antygenowej ułatwi ich klasyfikację. Chociaż stwierdzili, ze metody serologiczne nie mogą być używane do klasyfikacji gatunkowej bakterii brodawkowych, sądzą oni, że metody te mają jednak dużą wartość dla identyfikacji poszczególnych szczepów w hodowlach laboratoryjnych lub w naroślach korzeniowych, ze względu na stałość budowy antygenowej. Właściwości antygenowe szczepów *Rhizobium* są bowiem stałe, niezależne od składu pożywki i nie zmieniają się po przejściu bakterii przez inną roślinę niż ta, z której zostały wyodrębnione. Współczesne badania Kleczkowskiego i Thorntona (1944) oraz Vincenta (1949) i innych w zasadzie potwierdziły wnioski naszych badaczy. Pomiędzy budową antygenową (antygeny *O* i *H*), opornością na fagi, zdolnością wiązania wolnego azotu oraz innymi cechami fizjologicznymi i hodowlanymi — nie znaleziono korelacji. Metody serologiczne stosowane były również do odróżniania szczepów rodzimych od wprowadzonych do gleby jako szczepionki (Thornton i Kleczkowski 1954, Margaret Read 1953. Vincent i Woters 1953) oraz do typowania bakterii symbiotycznych pochodzących z jednej lub wielu brodawek jednej i tej samej rośliny (Vincent 1942, Vincent i Woters 1953, Read 1953). Wszyscy ci autorzy badali budowę antygenową bakterii brodawkowych, posługując się jedynie metodą aglutynacji.

Sądzimy, że wymienione tu prace nie wyczerpały jeszcze całokształtu zagadnienia i że należy przeprowadzić nad rizobiami systematyczne badania przy użyciu wszystkich metod serologicznych.

BADANIA WŁASNE

Ogólnym celem niniejszej pracy jest zbadanie budowy antygenowej i pokrewieństwa serologicznego pomiędzy kilkudziesięciu szczepami należącymi do różnych „gatunków" bakterii brodawkowych.

Badania te mają być przeprowadzone przy użyciu odczynu aglutynacji, z rozbiciem na antygen rzęskowy i somatyczny, przez wykonanie analizy receptorów między szczepami aglutynującymi między sobą oraz przy pomocy precypitacji probówkowej i dyfuzyjnej. Obecne doniesienie dotyczy wstępnych wyników tej pracy.

MATERIAŁ I METODY

Przygotowanie antygenu *H*. Szczepy hodowano na pożywce agarowej dla bakterii brodawkowych z mannitolem jako źródłem węgla. Inkubowano w 28°. Czas inkubacji był różny w zależności od szybkości wzrostu szczepów (od 48 godzin do 8-10 dni). Hodowle spłukiwano płynem fizjologicznym, dodawano 0,5% formaliny i wstawiano do temperatury 37° na 48 godzin. Gęstość zawiesiny określano przy pomocy skali Mc Farlanda.

Uodpornianie królików. Do doświadczeń użyto króliki o wadze 2-2,5 kg. Króliki te uodporniano wzrastającą dawką antygenu (0,25, 0,5, 1, 2, 3 ml) pięć razy co sześć dni. Po upływie 12-14 dni od ostatniego szczepienia sprawdzano miano i pobierano krew z tętnicy szyjnej.

Przygotowanie surowicy odpornościowej. Pobraną krew wstawiano do termostatu (37°) na 1-2 godzin. Następnie skrzep odkłuwano i całość wstawiano na kilkanaście godzin do chłodni, po czym odciągano surowicę znad skrzepu.

Wykonanie aglutynacji. Do odczynu aglutynacji użyto antygenów *H* uzyskanych z 40 różnych szczepów bakterii symbiotycznych: koniczyny, grochu, wyki, bobiku, lucerny, łubinu, seradeli, soi, przelotu i *Arachis*. Surowice odpornościowe otrzymano dla 20 szczepów, w tym: dla 4 szczepów *Rh. trifolii*, 3 szczepów *Rh. leguminosarum* dla grochu, 1 szczepu *Rh. leguminosarum* dla wyki, 6 szczepów *Rh. meliloti* i 6 szczepów *Rh. lupini* dla seradeli. Aglutynację wykonano w trzech powtórzeniach. Wyjściowe rozcieńczenia surowic użytych do badań wynosiły 1 : 40. Surowice rozcieńczano płynem Kocha. Aglutynacje odczytywano po 5-9 i po 24 godzinach trzymania surowic w 37°. Antygenu *O* dotychczas jeszcze nie zbadano.

Tabela I

Aglutynacja typu *H* pomiędzy różnymi szczepami *Rhizobium*
Agglutination type *H* between different strains of *Rhizobium*

Antygeny *H* szczepów / Antigens *H* of strains:		Surowice anty H dla szczepów: / Serum anti H for strains:																			
		Rh. trifolii szczepy dla koniczyny / strains from clover				*Rh. leguminosarum* szczepy dla grochu / strains from peas				*Rh. lupini* szczepy dla seradeli / strains from serradilla						*Rh. meliloti* szczepy dla lucerny / strains from lucerne					
	Symbole szczepów	b_1	*x*	*26F*	*N*	*1*	*5*	*222*	*67* (dla wyki / from vetch)	*4p*	*5*	*Og*	*K*	*B*	*S*	*Thp*	*Bp*	*413a*	*N94*	*Ch*	*Belg*
	2p	640	10240	0	0	640	—	0	10240												
	b_2	10240	20480	20480	10240	40960	20480	0	10240												
Rh. trifolii szczepy dla koniczyny / strains from clover	*3p*	320	0	0	0	0	0	0	0												
	325a	10240	20480	20480	20480	10240	0	0	20480												
	b_1	20480	20480	5120	2560	20480	10240	0	20480			0						0			
	x	20480	20480	5120	5120	40960	2560	0	10240												
	26F	20480	20480	20480	20480	40960	20480	0	20480												
	N	20480	20480	20480	20480	40960	20480	0	20480												
Rh. leguminosarum dla grochu / from peas	*1*	10240	5120	320	1280	40960	10240	0	5120												
	5	20480	10240	10240	5120	20480	20480	0	20480			0						0			
	222	0	0	0	0	0	0	1280	0												
Rh. leguminosarum dla wyki / from vetch	*67*	10240	20480	20480	1280	20480	10240	0	40960												
	4p									0											
	5										0										
Rh. lupini szczepy dla seradeli / strains from serradilla	*0g*											0									
	K		0				0		0				0					0			
	B													0							
	s														10240						
	Thp															5120	1280	40	10240	160	80
	Bp															1280	10240	0	5120	80	80
Rh. meliloti szczepy dla lucerny / strains from lucerne	*413a*		0				0		0			0				1280	640	10240	1280	0	0
	N94															2560	1280	0	10240	0	0
	Ch															0	0	160	80	10240	0
	Belg															0	0	640	160	0	2560
	Cz																				
Rh. lupini szczepy dla lubinu / strains from lupine	*271*																				
	K		0				0					0						0			
	R																				
	359a																				
Rh. japonicum szczepy dla soi / strains from soybeans	*94p*																				
	L		0				0					0						0			
	101C																				
	102C																				
Rhizobium sp. dla *Arachis* / from *Arachis*	*R*		0				0					0						0			
	Belg																				
Rh. phaseoli dla fasoli / from beans	*1*		0				0					0						0			
	3																				
Rh. leguminosarum dla bobiku / from horse-beans	*Og*		0				0					0						0			
	73																				
Rhizobium sp. dla *Anthyllis* / from *Anthyllis*	*P74*		0				0					0						0			

OGÓLNE WYNIKI I WNIOSKI

Wstępne wyniki badań przedstawia tabela I.

Na podstawie dotychczasowych danych widać wyraźnie pokrewieństwa serologiczne pomiędzy użytymi szczepami bakterii symbiotycznych koniczyny, grochu i wyki. Bakterie lucerny stanowiły odrębną grupę, która nie aglutynowała z żadną inną grupą *Rhizobium*. Wyniki te zgadzałyby się w dużym stopniu z pracami Kleczkowskiego i Thorntona (1944) oraz Vincenta (1949), którzy na podstawie budowy antygenowej wyodrębnili jako dwie osobne grupy bakterie brodawkowe lucerny oraz bakterie koniczyny i grochu.

Antygeny *H* szczepów bakterii symbiotycznych seradeli nie aglutynowały z surowicami homologicznymi oraz z żadną surowicą z innych badanych szczepów. Przyczyn tego jeszcze nie wyjaśniono.

LITERATURA

Białosuknia W., Klott C., 1923: Badania nad *Bacterium radicicola*. *Roczn. Nauk Roln.*, **9**: 288.

Kleczkowski A., Thornton H. G., 1944: A serological study of root-nodule bacteria from peas and clover inoculation groups. *J. Bact.*, **48**: 661.

Read M., 1953: The establishment of serologically identifiable strains of *Rhizobium trifolii* in field soils in competition with the native microflora. *J. gen. Microbiol.*, **9**: 1.

Vincent J. M., Woters L. M., 1953: The influence of the host on competition amongst clover root-nodule bacteria. *J. gen. Microbiol.*, **9**: 357.

D. Drożańska

STRUCTURE OF ANTIGENS IN DIFFERENT STRAINS OF *RHIZOBIUM*

Summary

The general purpose of the author is to characterise the antigenic structure and serological relationships among about 40 strains of *Rhizobium* derived from different kinds of leguminous plants. This paper gives a description of preliminary investigations. Twenty different sera have been obtained from rabbits vaccinated with strains of the following *Rhizobium* groups: *Rh. trifolii*, *Rh. leguminosarum* from pea, *Rh. leguminosarum* from vetch, *Rh. meliloti*, *Rh. lupini* from serradilla. With the use of the method of agglutination relationships of antigens *H* have been studied among 40 strains belonging to different groups of *Rhizobium* (see table I).

The author wants to use for further study different serological methods.

CONCLUSIONS

1. A clear relationship of the antigens *H* has been found to exist among the strains of *Rh. trifolii* and *Rh. leguminosarum* from peas and from vetch.

2. The strains of *Rh. meliloti* gave agglutination reactions only among this group of *Rhizobium.*

3. The antigenic relationship among the strains of *Rhizobia* derived from serradilla and from lupine should be studied in different ways.

These preliminary results have shown, that the antigenic structure of the examined *Rhizobia* is very specific.

DYSKUSJA

J. Brill

Wydaje się, że to co wiemy dziś o antygenach zawdzięczamy w dużym stopniu badaniom nad *Salmonella.*

K. Bereśniewicz

Czy autorka znalazła związek między budową antygenową a wirulencją bakterii?

Odpowiedź autorki

Istnieje wiele prac, które podkreślają brak zależności między budową antygenową a wirulencją i aktywnością bakterii.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1959, 8 : 253—258

M. Kowalski i *R. Staniewski*

WSTĘPNE BADANIA NAD WRAŻLIWOŚCIĄ RÓŻNYCH SZCZEPÓW *RHIZOBIUM* NA FAGI

Doniesienie

Z Zakładu Mikrobiologii Ogólnej Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Laird (1932) pierwszy próbował zróżnicować rizobia na podstawie ich wrażliwości na fagi. Badał on wrażliwość kilku szczepów *Rhizobium* na różne typy faga. Otrzymał jednak tak zmienne wyniki, że nie mógł wyciągnąć z nich żadnych wniosków.

Conn i jego współpracownicy (1945) zastosowali bakteriofagi do klasyfikacji rizobiów i podzielili je na 4 grupy:

1. Szczepy z koniczyny, grochu i fasoli
2. Szczepy z lucerny
3. Szczepy z soi
4. Szczep z *Phaseolus lunatus* L .

Rizobia należące do pierwszej grupy, obejmującej bakterie koniczyny, grochu i fasoli, dawały krzyżową lizę, to jest fagi bakterii koniczyny mogły rozpuszczać bakterie grochu i fasoli i odwrotnie, fagi bakterii grochu i fasoli wywoływały lizę szczepów koniczyny. Według Conna wskazywałoby to na ściślejsze pokrewieństwo między bakteriami tej grupy.

Szczepy bakterii lucerny, soi i *Phaseolus lunatus* były rozpuszczane jedynie przez fagi homologiczne.

Demolon (1951) otrzymał fagi bakterii koniczyny o innym zakresie działania. Fagi te nie rozpuszczały *Rhizobium* grochu i fasoli, działały natomiast na *Rhizobium* lucerny.

Wyodrębnione przez tego badacza fagi bakterii grochu rozpuszczały *Rhizobium* koniczyny i fasoli, a ponadto *Rhizobium* lucerny. Żaden z fagów bakterii koniczyny, grochu i fasoli, wyodrębnionych przez

Conna i współpracowników (1945), nie działał jednak na bakterie lucerny.

Kleczkowski i Thornton (1944) nie wykazali związku między pokrewieństwem serologicznym i wrażliwością na fagi. Innego zdania był jednak Marshall (1953, wg Vincenta 1954).

Jak wynika z tego przeglądu, typowaniu bakterii brodawkowych za pomocą fagów poświęcono dotychczas niewiele badań.

BADANIA WŁASNE

Ogólnym celem tej pracy były próby przeprowadzenia klasyfikacji szczepów *Rhizobium* należących do różnych ich grup z pomocą fagów. Do badań tych użyto fagów, działających na bakterie koniczynowe, ponieważ roślina ta jest u nas najpospolicie uprawiana. W związku z tym bowiem jej bakterie symbiotyczne są prawdopodobnie w naszych glebach bardzo rozpowszechnione.

METODYKA

Do wyodrębnienia faga z korzeni koniczyny wraz z otaczającą je glebą zastosowano zmodyfikowaną metodę Kleczkowskiej (1957). Korzenie koniczyny rozcierano z dodatkiem gleby i małej ilości wody wodociągowej. Całość po roztarciu wytrząsano przez 5-10 minut. Następnie sączono przez filtr Chamberlanda L 5. Otrzymany przesącz dodawano w ilości po 1 ml do 9 ml 24-godzinnej hodowli 8 szczepów *Rhizobium* koniczyny na zmodyfikowanej pożywce Hitchnera (Laird 1932).

Zaszczepione fagiem hodowle inkubowano w 28° przez 3 dni. Wyniki odczytywano co 24 godziny, porównując je z wynikami hodowli kontrolnych, to jest nie zaszczepionych fagiem. Miano faga w hodowlach sprawdzano metodą rozcieńczeń oraz na płytkach z agarem.

Wrażliwość szczepów *Rhizobium* na faga badano w sposób następujący: na powierzchnię płytek Petriego z agarem (wg Kleczkowskiej 1957) wylewano 24-godzinną płynną hodowlę badanego szczepu *Rhizobium*. Płytki suszono 2 godziny w termostacie w 37°. Następnie płytki te podzielono na odcinki, na które nakrapiano rozcieńczenia bakteriofaga.

Lizę zupełną w obrębie danych kropli, bez pojawienia się wzrostu wtórnego bakterii, oznaczano jako + +, lizę z lekkim wzrostem wtórnym — jako +, lizę częściową (widoczne odrębne łysinki) — jako ±, brak lizy przez −.

Postępując w ten sposób, do badań użyto 5 próbek korzeni koniczyny wraz z glebą otaczającą je. Były to: I. koniczyna czerwona (z pola), II. koniczyna biała (z pola), III, IV, V. koniczyna czerwona (z hodowli doniczkowej).

We wszystkich próbkach były obecne fagi. Przesącze tych 5 próbek materiału wyjściowego pasażowano na 8 różnych szczepach *Rhizobium* koniczyny. W sumie otrzymano więc 40 zlizowanych hodowli. Wszystkie te hodowle przepasażowano po 10 razy, używając do tego zawsze tych samych szczepów *Rhizobium*. Początkowe miano faga otrzymanego z przesączu wynosiło około 10^{-3}. Po kilku pasażach miano wzrastało do 10^{-10}. Z pomiędzy 40 zlizowanych hodowli do dalszej pracy wybrano 8 takich, w których fagi działały najsilniej. Z pomocą tych 8 hodowli fagów przeprowadzono badania nad wrażliwością 41 szczepów *Rhizobium* z kolekcji puławskiej. Szczepy te należały do grup bakterii: koniczyny, grochu, wyki, bobiku, lucerny, łubinu, seradeli, soi, fasoli, przelotu i *Arachis*.

Wyniki tych badań zamieszczono w tabeli I.

Tabela I

Wrażliwość różnych szczepów *Rhizobium* na fagi *Rh. trifolii*

Sussceptibility of different strains of *Rhizobium* to the phages of *Rh. trifolii*

Bakteriofag *Rh. trifolii* Bacteriophage of *Rh. trifolii*	Rozcieńczenie Dilution	Szczepy *Rhizobium* Strains of *Rhizobium*														
		Rh. trifolii								*Rh. leguminosarum*						
										dla grochu for peas			dla wyki for vetch	dla bobiku for horse-beans		
		2p	b_1	b_2	X	*3p*	*F*	*325a*	*N*	*1*	*5*	*222a*	*67*	*0g*	*73*	
I b_1	10^{-5}	±	±	±	±	+	++	±	+	±	±	—	±	—	—	
II *2p*	10^{-5}	±	±	+	±	±	++	±	+	+	±	—	±	—	—	
II *F*	10^{-5}	+	+	+	+	+	+	±	+	±	+	—	±	—	—	
II *325a*	10^{-6}	±	±	++	±	±	±	±	±	±	±	—	±	—	—	
III b_1	10^{-4}	+	+	+	+	+	+	++	+	±	±	—	+	—	—	
IV b_2	10^{-5}	±	±	±	+	+	±	±	±	±	±	—	+	—	—	
IV *325a*	10^{-4}	+	+	+	++	+	+	++	+	±	±	—	+	—	—	
V *N*	10^{-5}	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	—	+	—	—	

Następujące szczepy *Rhizobium* nie są wrażliwe na fagi *Rhizobium trifolii*:
Following strains are resistant to phages examined
Rh. meliloti dla lucerny — szczepy *Th, Bp, 413a, N 94, Ch, Belg*
Rh. lupini dla łubinu — szczepy *Cz, 271, K, R, 359a*
Rh. lupini dla seradeli — szczepy *4p, 5, K, B, S, P*
Rh. japonicum dla soi — szczepy *94p, L, 101c, 102c*
Rhizobium sp. dla *Anthyllis vulneraria* — szczep *P 74*, dla *Arachis* — szczepy *R, Belg*
Rh. phaseoli dla fasoli — szczepy *1 i 3.*
Objaśnienie znaków: — brak lizy; ± liza częściowa
Explanation of symbols: no lysis; partial lysis
\+ liza zupełna ze wzrostem wtórnym; ++ liza całkowita bez wzrostu wtórnego
complete lysis with secondary growth; complete lysis without secondary growth

OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ

Z przebadanych 41 szczepów *Rhizobium*, lizie pod wpływem 8 izolowanych fagów uległy wszystkie szczepy bakterii koniczyny, 2 szczepy bakterii grochu oraz 1 szczep bakterii wyki. Pozostałe szczepy, tj. bakterie: z bobiku, lucerny, łubinu, seradeli, soi, przelotu. *Arachis* i fasoli okazały się oporne na działanie tych fagów.

Badane przez nas fagi odróżniały się zakresem działania od fagów badanych przez Conna, gdyż nie wywoływały lizy *Rhizobium* fasoli. Jeszcze bardziej różniły się od fagów Demolona, które nie wywoływały lizy bakterii lucerny a rozpuszczały *Rhizobium* grochu.

Przy porównaniu własności badanych fagów należy stwierdzić ciekawy fakt, że żaden z nich nie działał na jeden z trzech badanych szczepów *Rh. leguminosarum* dla grochu (na szczep nr *222 a*).

Fagi III_{b1} i IV_{325a} w rozcieńczeniu 10^{-4} działały podobnie na wszystkie szczepy z tym, że na szczepie nr *325 a Rh. trifolii* oba dały całkowitą lizę Fag IV_{325a} rozpuszczał nadto szczep *X Rh. trifolii*.

Pozostałe 6 fagów wykazało pewne różnice pod względem działania na szczepy bakterii koniczyny, grochu i wyki. Na przykład fag oznaczony jako II_{2p} działał w stężeniu 10^{-5} na szczepy bakterii koniczyny b_2, *F* i *N* oraz na szczep bakterii grochu nr *1*, natomiast fag V_N działał tylko na szczep nr *67* bakterii wyki.

Charakterystyczne było to, że żaden z fagów nie wykazał silniejszego działania właśnie na te szczepy, na których był pasażowany. Można przypuszczać, że było to wynikiem bliskiego pokrewieństwa antygenowego użytych szczepów *Rh. trifolii*.

OGÓLNE WNIOSKI

1. Otrzymane przez nas 8 bakteriofagów koniczyny rozpuszczało nie tylko szczepy *Rh. trifolii* lecz także 2 szczepy (spośród 3 zbadanych) bakterii grochu i jeden szczep bakterii wyki.
2. Wrażliwość *Rhizobium* grochu i wyki na fagi bakterii koniczyny może wskazywać na pokrewieństwo między tymi grupami bakterii.
3. Badane fagi bakterii koniczyny nie oddziaływały wcale na bakterie z grupy: bobiku, lucerny, łubinu, seradeli, soi, przelotu, *Arachis* i fasoli.
4. Spośród 8 otrzymanych fagów 2 działały podobnie na szczepy bakterii koniczyny, grochu i wyki. Pozostałe 6 fagów działało z różną mocą na te wrażliwe szczepy.

LITERATURA

Allen E. K., Allen O. N., 1958: Biological aspects of symbiotic nitrogen fixation, w Encyclopoedia of Plant Physiol., VIII: Nitrogen metabolism.

Anderson E. S., 1957: The relationship of bacteriophages to bacterial ecology. *Symp. Soc. Gen. Microbiol.*, Cambridge Univ. Press., **7**: 193.
Conn H. J., Bother E. J., Randall C. H., 1945: The value of bacteriophage in classifying certain soil bacteria. *J. Bact.*, **49**: 359.
Demolon M. A., 1951: Contribution à l'étude de la symbiose bactérienne chez les légumineuses. *Rev. Gen. Bot.*, **58**: 562.
Kleczkowska J., 1957: A study of the distribution and the effects of bacteriophage of root-nodule bacteria in the soil. *Canad. J. Microbiol.*, **3**: 171.
Kleczkowski A., Thornton H. G., 1944: A serological study of root-nodule bacteria from peas and clover inoculation groups. *J. Bact.*, **48**: 661.
Laird D. G., 1932: Bacteriophage and the root-nodule bacteria. *Archiv. Microbiol.*, **3**: 159.
Vandecaveye S. C., Katznelson H., 1936: Bacteriophage as related to the root-nodule bacteria of alfalfa. *J. Bact.*, **5**: 465.
Vincent J. M., 1954: Presidential Address. *Proc. Linn. Soc. N. S. W.*, **79**: iv.

M. Kowalski and *R. Staniewski*

PRELIMINARY INVESTIGATIONS ON THE SUSCEPTIBILITY OF DIFFERENT STRAINS OF *RHIZOBIUM* TO PHAGES

Summary

The general aim of this work is to find out, wheather bacteriophages can be used for the purpose of classification of different groups and strains of *Rhizobium*.

The present paper gives a description of investigations carried out with 41 strains of *Rhizobium* on their susceptibility against different phages of *Rhizobium trifolii*.

The results are given in table I.

Besides the lysis of all the strains of *Rh. trifolii* investigated (8 strains) a lysis has been obtained by these factors only in the case of strains of *Rh. leguminosarum* for peas and for vetch. Strains of *Rhizobium* belonging to the groups of: horse-bean, lucerne, lupine, serradilla, soy-beans, *Anthyllis*, *Arachis* and *Phaseolus* have been resistant to the phages used (see table I).

DYSKUSJA

R. Staniewski

Uzupełnia swoje doniesienie, omawiając doświadczenia Razumowskiej, która jako jedna z pierwszych (już w 1930 r.) zwróciła uwagę na znaczenie bakteriofagów dla plonowania roślin motylkowych. Francuscy badacze Demolon i Dunez zajmowali się również tym zagadnieniem. Stwierdzili oni ujemny wpływ faga na plony lucerny i koniczyny oraz zwrócili uwagę na tzw. „zmęczenie gleb", np. jej wylucernienie lub wykoniczynienie spowodowane również przez faga. Nieco inaczej tłumaczy to zjawisko Kleczkowska, według której powstają jako mutanty formy *Rhizobium* oporne na faga, i zarazem nieaktywne. Na uwagę zasługuje fakt, że te same szczepy *Rhizobium*, które wytwarzają penicylinazę (por. badania Żelaznej) i dają aglutynację krzyżową (badania Drożańskiej) ulegają lizie pod wpływem faga.

M. Ruszkowska

Zjawisko zmęczenia gleby może być spowodowane nie tylko działaniem fagów, lecz również częściowym wyczerpaniem się podstawowych składników pokarmowych i mikroelementów w glebie.

J. Ziemięcka

Dotychczas prowadzono badania głównie nad fagami bakterii koniczyny i lucerny. Według Kleczkowskiej fagi występują zarówno w zmęczonych jak i w żyznych glebach. Nie stwierdzono, by cecha oporności na fagi była związana z budową antygenową, łączy się ona natomiast z wirulencją szczepu. Bakterie dobrze zakazające roślinę, a więc o dużej wirulencji, łatwiej ulegają działaniu fagów.

Z. Lorkiewicz

Istnieje duża zgodność w wynikach badań Żelaznej, Drożańskiej oraz Kowalskiego i Staniewskiego. Bakterie brodawkowe dla koniczyny, grochu i wyki są oporne na 1000 jednostek penicyliny, nie wytwarzają penicylinazy oraz wykazują pokrewieństwo serologiczne. Wyjątek stanowił tylko jeden szczep dla grochu (*222a*), który był wrażliwy na penicylinę, wytwarzał penicylinazę i nie dawał krzyżowych reakcji serologicznych z innymi szczepami dla grochu oraz ze szczepami koniczyny i wyki. Należałoby zatem wyjaśnić, czy istotnie szczep ten należy do bakterii brodawkowych dla grochu.

T. Wróbel

Szczepy *Rhizobium* pochodzące ze Związku Radzieckiego, między innymi szczep dla grochu nr *222a*, morfologicznie różnią się od naszych szczepów. Doświadczenia, których celem było sprawdzenie aktywności tych szczepów w naszych warunkach, wykazały, że w porównaniu z niektórymi naszymi szczepami mają one słabą zdolność wiązania azotu.

J. Brill

Fagi stanowią ważne zagadnienie we współczesnej wirusologii. W badaniach nad *Rhizobium* często możemy mieć do czynienia ze zjawiskiem bezobjawowego zakażenia fagami. Aby wykazać obecność faga w takich lizogenicznych szczepach stosuje się obecnie indukcję promieniami *UV*. Szczepy takie mogą oddać bardzo duże usługi w badaniach nad *Rhizobium*. Podobne zagadnienia wyłaniają się w badaniach nad maczugowcami błonicy i włoskowcami różycy świń.

Odpowiedź autorów

Odpowiadając prof. Brillowi trzeba wspomnieć o pracy Marshalla (1957), dotyczącej lizogenicznego szczepu *Rhizobium*. Autor ten prowadził doświadczenia polowe przy użyciu szczepu lizogenicznego (dawcy faga) i szczepu wrażliwego (biorcy). Stwierdził on, że po pewnym czasie zawsze dominował szczep lizogeniczny. W Zakładzie Mikrobiologii Ogólnej UMCS w Lublinie projektuje się badania szczepów *Rhizobium* z punktu widzenia ich lizogeniczności.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1959, 8 : 259—269

J. Gołębiowska

NIEKTÓRE ZAGADNIENIA WSPÓŁŻYCIA ROŚLIN MOTYLKOWYCH Z BAKTERIAMI

Referat przeglądowy

Z Zakładu Mikrobiologii Rolnej Instytutu Uprawy, Nawożenia i Gleboznawstwa w Puławach

DOTYCHCZASOWE POGLĄDY NA WARUNKI ROZWOJU AKTYWNEJ SYMBIOZY

Współżycie roślin motylkowych z bakteriami interesuje nas jako bardzo ciekawe zjawisko biologiczne, a zarazem ze względu na zdolność przyswajania azotu atmosferycznego przez ten system symbiotyczny, ma ono duże znaczenie praktyczne.

Istota tego współżycia polega na wzajemnej wymianie usług między partnerem roślinnym i bakteryjnym. W procesie fotosyntezy roślina gromadzi węglowodany, które częściowo służą bakteriom jako pokarm i jako materiał oddechowy. Natomiast system enzymatyczny wytwarzany przez bakterie umożliwia roślinom karmienie się azotem atmosferycznym. Wiązanie azotu możliwe jest tylko w okresie życia obu współżyjących ze sobą organizmów.

Powierzchnia, na której odbywa się proces wiązania N musi ulegać stałej odnowie. Rola enzymów nie ograniczałaby się więc przy tym procesie o charakterze endoenergetycznym do zwykłego działania katalitycznego, lecz byłaby znacznie bardziej skomplikowana.

Na ogół przyjmuje się, że najważniejszym czynnikiem, decydującym o wyniku symbiozy jest aktywność szczepu bakteryjnego. Zainteresowanie właściwościami *Rhizobium* datuje się od prac Hellriegla i Wilfartha, Beijerincka i Prażmowskiego. Ten ostatni stwierdził ostatecznie, że rośliny motylkowe mogą żywić się azotem z powietrza tylko przy współżyciu z bakteriami z rodzaju *Rhizobium*. Nic więc dziwnego, że *Rhizobium*

i jego właściwości przez długie lata uważano za czynnik decydujący o wyniku symbiozy.

W miarę rozwoju badań nad symbiozą coraz więcej uwagi zaczęto zwracać także na środowisko odżywcze roślin, na wpływ warunków glebowych i na mikroklimat. Na przykład nie trudno było zauważyć, że w obecności azotu, chociaż obserwuje się nodulację, charakter jej odbiega od normalnego. Ostatnio temu zagadnieniu wiele pracy poświęciła M i e c z y ń s k a i współpracownicy (1952). Również wpływ wapnowania roślin motylkowych na symbiozę, wpływ nawożenia fosforowego i potasowego oraz sprawa dokarmiania roślin motylkowych mikroelementami, przede wszystkim borem i molibdenem stanowiły i stanowią nadal przedmiot licznych badań. Przy rozpatrywaniu wpływu warunków fizycznych na symbiozę najwięcej stosunkowo uwagi poświęca się sprawie światła i warunków tlenowych.

Szerzej nie omawiam tych zagadnień, gdyż na ogół są one dobrze znane, a ostatnie lata niewiele tu wniosły nowego.

UZDOLNIENIE RÓŻNYCH PRZEDSTAWICIELI RODZINY *LEGUMINOSAE* DO SYMBIOZY Z *RHIZOBIUM*

Coraz bardziej natomiast zaczęto zajmować się samą rośliną jako równorzędnym partnerem w systemie symbiotycznym. Jak wykazały liczne już obserwacje rodzajowe i gatunkowe a nawet odmianowe cechy roślin mogą decydować o możliwości współżycia danej rośliny z bakteriami i o wynikach tej symbiozy.

A l l e n i B a l d w i n (1954) podają następujące zestawienie, ilustrujące uzdolnienia do symbiozy u różnych przedstawicieli rodziny *Leguminosae:*

Podrodzina	Liczba gatunków zbadanych		
	Ogółem	zdolnych do symbiozy	niezdolnych do symbiozy
Papilionatae	969	912	57
Mimozoideae	130	118	12
Caesalpinioideae	97	33	64

Specjalnie często spotyka się gatunki, u których nie zaobserwowano zdolności do brodawkowania, w obrębie podrodziny *Caesalpinioideae*. Na przykład u rodzaju *Cassia* poznano 16 gatunków brodawkujących oraz 20 gatunków wyraźnie nie mających tej zdolności. Przyczyny tych różnic nie zostały dotychczas poznane. Nasuwa się więc pytanie, dlaczego niektóre rośliny motylkowe nie mogą współżyć z *Rhizobium* i odwrotnie dlaczego właśnie tylko w rodzinie *Leguminosae* tak licznie występują rośliny

mające tę zdolność. Wprawdzie znajdujemy coraz to więcej danych świadczących o możliwości współżycia z bakteriami roślin należących do innych rodzin, jednak możliwości ich pod tym względem są bez porównania skromniejsze niż u roślin motylkowych. W najnowszym przeglądzie prac na ten temat Allenowie (1958) podają że tworzenie się narośli korzeniowych zaobserwowano już na 65 gatunkach należących do 8 różnych rodzin, np. u *Alnus* z rodziny *Betulaceae*, u *Eleagnus* z rodziny *Eleagnaceae* i innych. Zdolność wiązania azotu u tych roślin przejawia się jednak bardzo słabo.

Pragnąc wyjaśnić dlaczego rośliny motylkowe są specjalnie przystosowane do omawianej symbiozy zaczęto bliżej zajmować się samą rośliną, mechanizmem jej zakażania przez symbionty, sposobem rozwoju narośli korzeniowych oraz ich czynnością.

Zakażenie następuje najczęściej przez włośniki, ale nie u wszystkich roślin. Nutman (1956) podaje, że np. u roślin wodnych bakterie wnikają wprost do komórek epidermy, a u Arachis ogniska zakażenia tworzą się u nasady korzeni bocznych. Obserwacje te podważałyby przekonanie o znaczeniu kwasu indolooctowego wydzielanego przez bakterie jako pierwszego czynnika warunkującego symbiozę. Kwas indolooctowy powoduje bowiem skręcanie się włośnika i przygotowuje go do przyjęcia bakterii. Stwierdzono ponadto, że kwas indolooctowy nie działa swoiście i że powoduje on skręcanie się włośników u roślin motylkowych niezależnie od gatunku *Rhizobium*, który ten kwas wydziela. Georgii Beguin (1939) stwierdzają też, że nie ma różnic w ilości wydzielanego kwasu przez szczepy aktywne i nieaktywne *Rhizobium*. Nie wszystkie też zakażone włośniki dają początek naroślom korzeniowym. Nutman (1956) podaje, że zwykle tylko około 5% zakażonych włośników daje początek prawidłowo rozwiniętym brodawkom. Tworzenie nitki bakteryjnej i przenikanie jej do korzenia trwa od kilku godzin (koniczyna) do dwu dni (groch). Poznanie tego umożliwiły badania Fåhreus (1957), w których zastosowanie prostej i ciekawej techniki pozwoliło na obserwację zakażeń w bardzo wczesnych stadiach rozwoju rośliny.

Wchodzące do korzenia bakterie wytwarzają łańcuszek, który z małymi wyjątkami wnika do wnętrza komórek gospodarza roślinnego. Ciekawą obserwację stanowi to, że zakażane są komórki o podwójnej ilości chromozomów, które zawsze w pewnej ilości występują w tkance roślinnej. Wipf (1939) oraz Wipf i Cooper (1938) stwierdzili, że ilość chromozomów w komórkach brodawek korzeniowych zawsze jest podwójna w stosunku do ilości chromozomów w innych komórkach danej rośliny. Na przykład u *Medicago*, która normalnie zawiera $2n=16$ chromozomów, w komórkach narośli korzeniowych znajduje się 32 (4n) chromozomów. Wipf sprawdziła to zjawisko u 31 gatunków roślin motylkowych. Nie

wiadomo jednak, czy podwojenie ilości chromozomów w komórkach narośli korzeniowych jest wynikiem zakażenia czy też są zakażane tylko komórki o podwójnej ilości chromozomów. Jednym słowem nie wiadomo co jest skutkiem a co przyczyną. Możliwe jednak, że brak spontanicznie tworzących się tetraploidów w korzeniach niektórych motylkowych warunkuje niezdolność do symbiozy. Powstaje pytanie, czy przez zwiększenie ilości komórek o podwójnej ilości chromozomów na korzeniach roślin nie można byłoby zwiększyć ilości ognisk zakażenia? Zagadnienie to starał się wyjaśnić Bonnier (1954), oddziaływając na roślinę kolchicyną. Badania swoje prowadzi on z *Medicago sativa* i *Trifolium pratense*. W kulturach agarowych stwierdził, że przy dodatku 0,5 ml roztworu kolchicyny w stężeniu 1 : 25000 do probówki z jedną rośliną działa ona pobudzająco na tworzenie się narośli, nie zmieniając morfologii roślin. Silniejsze koncentracje kolchicyny źle wpływały na rozwój roślin.

W Szwecji w związku z wprowadzeniem do uprawy koniczyny tetraploidalnej Nilsson i Rydin (1954) badali, czy współżycie tej koniczyny z bakteriami jest aktywniejsze niż diploidalnej i czy może ona współżyć z tymi samymi rasami *Rhizobium* co i koniczyna zwykła. W dalszych badaniach Nilsson, Korsan i Mellander (1954) starali się poznać, jakie są różnice w składzie chemicznym, głównie w składzie aminokwasowym obu koniczyn. W wyniku tych badań stwierdzono, że nie było specjalnych różnic ani pod względem podatności na symbiozę z określonymi szczepami *Rhizobium*, ani też w składzie aminokwasowym obu roślin. Na marginesie tych badań zauważono tylko, że reakcja z ninhydryną była silniejsza u roślin współżyjących z *Rhizobium* niż u roślin karmionych azotem azotanowym.

Czynnikiem ograniczającym zdolność tworzenia nowych narośli na roślinach już zakażonych może być też, wg Nutmana (1952), szybki podział tkanki twórczej w ogniskach zakażenia. Zauważył on przy tym, że ograniczyć powstawanie brodawek może także aktywność tkanki pierwotnej w miejscach powstawania korzeni bocznych.

Usunięcie rozwijających się brodawek lub wierzchołków korzeni bocznych prowadziło do stymulowania infekcji w okresie następującym zaraz po tej operacji; świadczyłoby to o tym, że inhibitorem niekoniecznie może być tkanka bakteroidalna, lecz także rozwijająca się tkanka merystematyczna.

W badaniach amerykańskich (Allen i Allen 1954, Harris, Allen i Allen 1949) zwrócono uwagę na swoisty stosunek nitki infekcyjnej do jąder komórek roślinnych. Zauważono, że nitka bakteryjna kieruje się zazwyczaj prosto w stronę jądra, czasem otacza je jakby ramionami, nie atakując go jednak we wczesnych stadiach zakażenia. W późniejszych stadiach rozwoju tkanki bakteroidalnej, w miarę wypeł-

niania się komórek roślinnych bakteriami, jądra i masa cytoplazmatyczna komórek roślinnych ulegają hypertrofii.

Parker i Allen (1952) znajdują, że o ile brak jest pokrewieństwa między rośliną i bakterią nie dochodzi do właściwej symbiozy. Stwierdzili oni, że *Rhizobium,* które towarzyszy *Trifolium ambiguum* nie wytwarza prawidłowo rozwiniętych narośli korzeniowych na tej roślinie. Szczepy te jednak mogły zakażać inne gatunki koniczyn. Świadczyłoby to o wpływie dziedzicznych cech gatunkowych roślin na ich podatność na symbiozę.

DZIEDZICZENIE PODATNOŚCI NA SYMBIOZĘ U KONICZYNY CZERWONEJ

Poza tym obserwacje wykazały, że często w populacjach roślinnych występują takie osobniki, które nie brodawkują. Zjawiskiem tym zainteresował się bliżej Nutman i opublikował szereg prac na ten temat (Nutman 1946, 1948, 1949, 1952 a i b, 1953, 1954 a, 1954 b, 1956, 1957, Nutman i Bergersen 1957).

Nutman pracował nad koniczyną, posługując się nasionami odmiany handlowej Montgomeryshire Red-Clover. Zauważył on, że wśród roślin rosnących w jednakowych warunkach i szczepionych tym samym szczepem *Rhizobium* można znaleźć rośliny oporne na symbiozę, a więc nie brodawkujące. Zainteresował się bliżej tymi roślinami, przeprowadził nad nimi szereg doświadczeń i stwierdził, że cecha wrażliwości lub oporności na symbiozę może być u koniczyny dziedziczna. Rozdzielał on całe populacje na linie oporne i wrażliwe, robił między nimi krzyżówki i następnie wszystkie nowe pokolenia roślin szczepił jednakowym szczepem *Rh. trifolii.* Doświadczenia te przeprowadzał z setkami roślin. Otrzymał wynik potwierdzający jego przypuszczenia o dziedziczeniu cechy warunkującej oporność na symbiozę. Przy krzyżowaniu bowiem roślin o różnej wrażliwości na symbiozę otrzymywał następujące ilości roślin wykazujących ograniczoną zdolność do symbiozy:

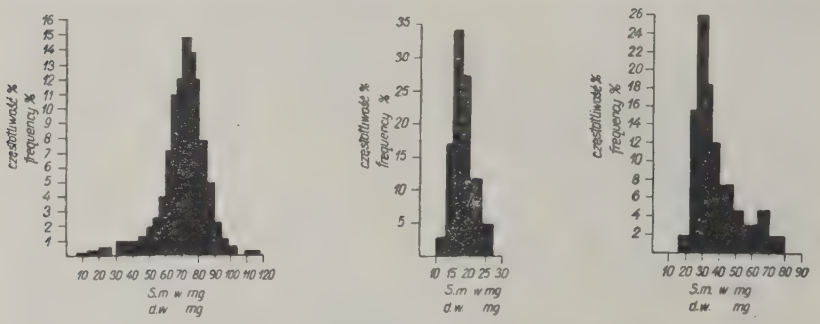
wrażliwa × wrażliwa = 1-5% niepodatnych na symbiozę
wrażliwa × oporna = 1-17% „ „ „
oporna × oporna = 4-98% „ „ „

Dalsze jego badania pozwoliły na stwierdzenie, że cecha oporności na zakażenie u tej koniczyny jest cechą recesywną, związaną ze składnikiem cytoplazmatycznym przenoszonym przez matkę. Ponieważ oporność związana jest z żeńską komórką, cecha ta dłużej utrzymuje się u roślin samopylnych. Do ciekawszych obserwacji Nutmana należy jeszcze to, że cecha warunkująca symbiozę nie oddziałuje na metabolizm rośliny. Zarówno rośliny oporne jak i wrażliwe karmione azotem związanym zachowują się jednakowo. Co prawda, u roślin opornych na symbiozę daje się czasem zauważyć skłonność do karłowatości, chlorozy i słabego zawiązywania

strąków, jednak wydaje się, że cecha oporności lub cecha wrażliwości na zakażenie może występować na pozór w tym samym biotypie.

ROLA BAKTERII W AKTYWNOŚCI SYMBIOZY

Rozpatrując oddziaływanie różnych szczepów bakteryjnych na określone linie użytej do badań koniczyny Montgomeryshire Red-Clover Nutman stwierdził, że o podatności na symbiozę u rośliny można mówić tylko w odniesieniu do określonego szczepu bakteryjnego. Bywa tak,



Rys. 1. Zmienność reakcji roślin koniczyny na szczepienie *Rhizobium* o różnej aktywności (wg Nutmana 1954 r.).

Fig. 1. Variability of the reaction of clover plants inoculated by different strains of *Rhizobium*

a — szczep aktywny — active strain; *b* szczep nieaktywny — inactive strain; *c* — szczep pośredni — intermedium strain

że linie oporne na symbiozę ze szczepem *A* mogą brodawkować ze szczepem *B* i odwrotnie. Szczepiąc koniczynę szczepami o różnej aktywności Nutman otrzymał obrazy przedstawione na rysunku 1.

Praktycznie więc daje się wyróżnić szczepy aktywne i nieaktywne. Zagadnienie wirulencji i aktywności samego *Rhizobium* zostało dokładniej omówione w referacie Ziemięckiej.

OBJAWY AKTYWNEJ I NIEAKTYWNEJ SYMBIOZY

Według Allenów (1958) brodawki korzeniowe tworzą się pod wpływem aktywatorów i inhibitorów wzrostu powstających w wyniku wzajemnego oddziaływania na siebie roślin i bakterii. Obserwowali oni (Allen, Allen i Newman 1953) wykształcanie się narośli na korzeniach 6 różnych rodzajów roślin motylkowych pod wpływem niewielkich dawek kwasu 2-bromo-3,5-dwuchlorobenzoesowego. Były to jed-

nak brodawki nieczynne, bez tkanki bakteroidalnej, które uznano za zmodyfikowane korzenie boczne. Podobne narośle znajdował Izrailski (1957) na korzeniach lucerny po zadziałaniu na nie kwasem dezoksyrybonukleinowym. Bonnier (1958) znajduje, że podobne narośle, bardzo słabo zasiedlone bakteriami, mogą tworzyć się na różnych roślinach motylkowych pod wpływem nieswoistych dla nich gatunków *Rhizobium*. Dzieje się to wówczas gdy substancje — inhibitory produkowane przez roślinę i hamujące rozwój zakażenia zostaną usunięte z podłoża z pomocą węgla aktywowanego. Takie narośle nazywa on „formes intermédiaires" stwierdzając, że różnią się one histologicznie od tych, w których możliwe jest wiązanie azotu. Turner (1955), a także Vantsis i Bond (1950) znajdują również korzystny wpływ węgla aktywowanego w podłożu na nodulację i wiązanie azotu, uważając podobnie jak Bonnier, że na materiale tym mogą zbierać się substancje inhibitory normalnie ograniczające nodulację.

Wiązanie azotu możliwe jest tylko przy pełnym wykształceniu brodawek korzeniowych.

Allenowie (1958) w dojrzałej dobrze zbudowanej brodawce rozróżniają cztery rodzaje tkanki:

1. „The nodule cortex" — tkanka korowa, składająca się z 4-10 warstw komórek niezakażonej parenchymy,

2. „The meristematic zone" — strefa tkanki twórczej czyli aktywnego podziału i wzrostu,

3. „The vascular system" — system naczyniowy, służący do transportu substancji odżywczych z rośliny do brodawki i odwrotnie,

4. „The bacteroidal zone" — tkanka bakteroidalna w środku brodawki. Jest to miejsce wiązania azotu. Infekcja wywołuje zazwyczaj hypertrofię tkanki, w wyniku czego brodawki z tkanką bakteroidalną są 4-8 razy większe niż nie zakażone.

Dojrzałą brodawką nazywa się taką, w której wszystkie wymienione partie są już dobrze wykształcone. Wszystkie one są potrzebne dla normalnego funkcjonowania brodawki. Nie określono jednak w jakim momencie dojrzałości brodawki rozpoczyna się w niej wiązanie azotu.

Mówiąc o rozwoju czynnych brodawek świadomie nie poruszam tu roli czerwonego barwnika, gdyż zagadnienie to będzie omówione w referacie Mieczyńskiej.

Dotychczasowe próby określenia czynności systemu symbiotycznego ograniczały się przeważnie do oznaczeń biochemicznych, o których będzie mówić Wróbel Wydaje się nam jednak, że dokładne prześledzenie rozwoju tkanki bakteroidalnej, z uwzględnieniem przemian w budowie komórek samych bakteroidów w czasie rozwoju brodawek korzeniowych, może też być pomocne przy rozróżnianiu aktywnej i nieaktywnej symbiozy już

w bardzo wczesnych stadiach rozwoju rośliny. Może to również przyczynić się do określenia roli bakteroidów przy wiązaniu azotu. Świadczą o tym wyniki pracy Bergersena (1955) omówione przez Ziemięcką.

Nie wiadomo dotychczas jaki czynnik powoduje rozwój tkanki bakteroidalnej. Próbowano wywołać tworzenie się bakteroidów na podłożach sztucznych, działając różnymi związkami chemicznymi na hodowle *Rhizobium in vitro*. Różni badacze np. Bazarewski (1927, 1929) lub Itano i Matsuura (1938) podają, że bakterie specjalne są pobudzone do tworzenia form bakteroidalnych przez kofeinę, pirydynę, strychninę i związki chinonowe. Naszym zdaniem (Gołębiowska 1958) formy te nie są jednak jednoznaczne z bakteroidami, stanowiącymi jedno z naturalnych ogniw w cytomorfozie *Rhizobium*. Formy na podłożach sztucznych są formami involucyjnymi, które czasem przypominają kształtem bakteroidy, lecz nie przechodzą bakteroidalnego procesu dojrzewania, związanego ze zdolnością wiązania azotu. Te nasze obserwacje potwierdzałyby twierdzenie Demolona (1952) o niemożliwości wykształcania się bakteroidów poza rośliną. Sprawa ta wymaga jednak dalszych bardziej precyzyjnych badań przy zastosowaniu metod cytologicznych.

PRZYDATNOŚĆ BADAŃ CYTOCHEMICZNYCH DLA POZNANIA STOPNIA SKUTECZNOŚCI SYMBIOZY

Sądzimy, że specjalne usługi mogą tu oddać metody cytochemiczne, których rozwój w bakteriologii zrobił w ostatnich latach wielkie postępy. Dzięki specjalnym metodom barwienia możemy obecnie wyróżniać różne składniki komórki ważne ze względu na ich funkcję. W ten sposób możemy poznać przemiany zachodzące w substancji jądrowej, rozwój ziarnistości mitochondrialnych będących ośrodkami procesów oksydoredukcyjnych i charakter substancji zapasowych, gromadzonych przez aktywne i nieaktywne szczepy *Rhizobium*.

Nasze wstępne obserwacje prowadzone z różnymi odmianami i rodami łubinów i seradeli, które zreferujemy w osobnych doniesieniach (Gołębiowska i Sypniewska, Sypniewska) wskazują na to, jak różnorodnie mogą rozwijać się bakteroidy w naroślach korzeniowych i w jak różny sposób mogą przebiegać procesy ich dojrzewania. Przypuszczamy, że praca nasza prowadzona w tym kierunku będzie mogła przyczynić się do wyjaśnienia roli bakteroidów przy wiązaniu azotu i wpływu rośliny na wynik symbiozy.

LITERATURA

Allen O. N., Allen E. K., 1954: Morphogenesis of the leguminous root-nodule. *Brookhaven Symposia in Biol.*, **6**: 209. Wg Allen a. Allen 1958.

Allen E. K., Allen O. N., 1958: Biological aspects of symbiotic nitrogen fixation. W Handbuch der Pflanzenphysiologie, Springer Verlag, Berlin, s. 95.

Allen E. K., Allen O. N., Newman A. S., 1953: Pseudonodulation of leguminous plants induced by 2-bromo-3,5-dichlorbenzoic acid. *Am. J. Botan.*, **40:** 429. Wg *Zentr. Bakter. II*, **1954, 108:** 104.

Allen O. N., Baldwin J., 1954: Rhizobia — Legume relationships. *Soil Sci.*, **78:** 6.

Bazarewski S., 1927: Badania nad bakteroidami. *Roczn. Nauk Roln.*, **17:** 1.

Bazarewski S., 1929: Wpływ kofeiny na wiązanie wolnego azotu przez bakterie brodawkowe. *Roczn. Nauk. Roln.*, **21:** 473.

Bergersen F. J., 1955: The cytology of bacteroids from root-nodules of Subterraneam Clover (*Trifolium subterraneum* L.) *J. gen. Microbiol.*, **13:** 411.

Bonnier Ch., 1954: Action de la colchicine sur la symbiose *Rhizobium* — *Medicago sativa* et *Trifolium pratense*. *Bull. Inst. Agronom. et Sta. Rech. Gembloux*, **12:** 3.

Bonnier Ch., 1958: La spécificité dans la symbiose *Rhizobium* — Légumineuses. Faits expérimentaux, concernant la genèse de la nodulation. *J. Microbiol. Serol. A. v. Leeuvenhoek*, **24:** 1.

Demolon A., 1952: Contribution à l'étude de la symbiose bactérienne chez les légumineuses. W *Extrait de la Revue générale de Botanique*, **58:** 1951.

Fåhreus G., 1957: The infection of clover root hairs by nodule bacterie studied by a simple glass slide technique. *J. gen. Microbiol.*, **16:** 374.

Georgi C. E., Beguin A. E., 1939. Heteroauxin production by efficient and inefficient strains of Rhizobia. *Nature*, **143:** 25.

Gołębiowska J., 1958: Tworzenie bakteroidów i form inwolucyjnych przez *Rhizobium meliloti* i *Rh. trifolii*. Sprawozdanie z Sesji Naukowej poświęconej roślinom pastewnym, Poznań, czerwiec 1958 (w druku).

Harris J. O., Allen E. K., Allen O. N., 1949: Morphological development of nodules on *Sesbania grandiflora* Poir., with reference to the origin of nodule rootlets. *Amer. J. Botan.*, **36:** 651. Wg Allen, 1958.

Itano A., Matsuura A., 1938: *Ber. Ohara Inst.* Wg Allen a. Allen, 1958.

Izrailski W. P., 1957: Issledowanije izmienienija kłubienkowych baktierii pri rostie ich w filtratach drugich baktierii i diejstwie etich filtratow na rastienije. *Mikrobiołogija*, **26:** 511.

Mieczyńska-Nowotny A., Ruszkowska M., 1952: Wpływ azotu mineralnego na rozwój szczepionych roślin motylkowych. *Acta Microbiol. Polon.* **1:** 205.

Nilson E., Korsan-Bengtsen K., Mellander O., 1954: Aminoacid content of leguminous proteins as affected by genetic and nutritional factors. *Archiv Mikrobiol.* **20:** 404.

Nilson E., Rydin C., 1954: Studies on symbiotic nitrogen fixation by a new strain of tetraploid red clover. *Archiv Mikrobiol.*, **20:** 398.

Nutman P. S., 1946: Genetical factors concerned in the symbiosis of clover and nodule bacteria. *Nature*, **157:** 463.

Nutman P. S., 1948: Physiological studies on nodule formation. I. The relation between nodulation and lateral root formation in red clover. *Ann. Botan., N. S.*, **12:** 81.

Nutman P. S., 1949: Nuclear and cytoplasmic inheritance of resistance to infection by nodule bacteria in red clover. *Heredity*, **3:** 263.

Nutman P. S., 1952a: Physiological studies on nodule formation. III. Experiments on the excision of root-tips and nodules. *Ann. Botan., N. S.*, **16:** 79.

Nutman P. S., 1952b: Host factors influencing infection and nodule development in leguminous plants. *Proc. Roy. Soc., Ser. B.* **139:** 176.

Nutman P. S., 1954 a: Symbiotic effectiveness in nodulated red clover. I. Variation in host and in bacteria. *Heredity*, **8**: 35.
Nutman P. S., 1954 b: Symbiotic effectiveness in nodulated red clover. II. A major gene for ineffectiveness in the host. *Heredity*, **8**: 47.
Nutman P. S., 1956: The influence of the legume in root-nodule symbiosis. A comparative study of host determinants and functions. *Biol. Rev.*, **31**: 109.
Nutman P. S., 1957: Symbiotic effectiveness in nodulated red clover. III. Further studies on inheritance of ineffectiveness in the host. *Heredity*, **11**: 157.
Nutman P. S., Bergersen F. J., 1957: Symbiotic effectiveness in nodulated red clover, IV. The Influence of the host factors upon nodule structure and cytology. *Heredity*, **11**: 175.
Parker D. T., Allen O. N., 1952: The nodulation status of *Trifolium ambiguum*. *Soil. Sci Proc.*, **16**: 350. Wg *Zentr. Bakter. II*, **1954**, **108**: 104.
Turner E. R., 1955: The effect of certain adsorbents on the nodulation of clover plants. *Ann. Botan., N. S.*, **19**: 73.
Vantsis J. T., Bond G., 1950: The effect of charcoal on the growth and nodulation of leguminous plants in sand cultures. *Ann. Appl. Biol.*, **37**: 159.
Wipf L., Cooper D. C., 1938: *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **24**: 87. Wg Bonnier, **1954**.
Wipf L., 1939: *Botan. Gaz.*, **101**: 51. Wg Bonnier, 1954.

J. Gołębiowska

SOME PROBLEMS CONCERNING THE SYMBIOSIS OF LEGUMINOUS PLANTS WIHT BACTERIA

Summary

In this review the following questions are discussed: 1) The conditions for symbiotic effectiveness. 2) The ability of different leguminous plants to live together with bacteria. 3) Host plant factors influencing symbiotic effectiveness. 4) Inheritance of symbiotic effectiveness in host plant. 5) The influence of *Rhizobium* on the efficiency of nitrogen fixation. 6) Symptoms of effective and ineffective symbiosis. 7) Cytochemical studies on the symbiotic effectiveness.

DYSKUSJA

J. Ziemięcka

Nutman sądzi, że roślina jest ważniejszym partnerem w symbiozie, niż *Rhizobium*. Jakie jest zdanie autorki? Proszę o dane na temat zawiązywania symbiozy przez różne szczepy *Rhizobium* na jednej roślinie. Czy jest to możliwe?

Nad wiązaniem azotu przez same *Rhizobium* pracowali już Matylda Löhnis, Winogradski, Schäde i inni. Winogradski stwierdził, że ilości azotu związanego przez samo *Rhizobium* są tak niewielkie, że nie mogą być brane pod uwagę. Badania nad tym, czy roślina niezakażona jest zdolna do wiązania wolnego azotu, nie dały też pozytywnych wyników.

A. Drozdowicz

Problem wiązania wolnego azotu przez samo *Rhizobium* z pominięciem rośliny należy uznać jeszcze za otwarty. Perlmanówna badała jeszcze przed wojną, w Za-

kładzie prof. Bassalika, zdolność wiązania azotu przez samo *Rhizobium*. Pomimo, że otrzymane przyrosty azotu nie przekraczały w zasadzie granicy błędu, stwierdzono czasem nagłe wyskoki w przyrostach azotu, świadczące, że przypuszczalnie zachodziło wtedy wiązanie wolnego azotu. Nie zdołano jednak stwierdzić, jakie warunki wywoływały to spontaniczne wiązanie wolnego azotu *in vitro*. Turczyn, w swej pracy dysertacyjnej nad symbiotycznym wiązaniem azotu, przy zastosowaniu N^{15} stawia hipotezę, że czynnikiem wiążącym azot jest roślina. Azot przedostaje się dopiero wtórnie do komórki bakteryjnej.

Z. Lorkiewicz

Czy prowadzone były badania nad wpływem puryn na przekształcanie się *Rhizobium* w bakteroidy?

Odpowiedź autorki

Istniało przypuszczenie, że roślina zakażona jednym szczepem nie może już być zakażana innym szczepem. Jednakże Wilson prowadził kultury wodne roślin motylkowych, dzieląc korzenie na trzy partie i umieszczając każdą z nich w innym naczyniu. Do każdego naczynia dodawano szczep o innej aktywności i w ten sposób uzyskiwano zakażenie jednej rośliny kilkoma szczepami bakteryjnymi.

Badano wpływ guaniny na powstawanie bakteroidów *in vitro* i uzyskiwano powstawanie form podobnych do bakteroidów.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1959, 8 : 271—281

A. Nowotny-Mieczyńska

NIEKTÓRE PROBLEMY MECHANIZMU WIĄZANIA WOLNEGO AZOTU

Z Zakładu Fizjologii Roślin Instytutu Uprawy, Nawożenia i Gleboznawstwa w Puławach

Mechanizm wiązania wolnego azotu wciąż nie jest jeszcze całkowicie rozwiązanym zagadnieniem, jakkolwiek od pionierskich badań Hellriegela, Beijerincka, Prażmowskiego i innych upłynęło już z górą 60 lat. Winogradski, w swym zbiorowym wydaniu prac przyznaje się, że pięćdziesiąt lat temu, a więc wtedy, kiedy rozpoczynał swoją pracę badawczą, problem ten wydawał mu się dużo łatwiejszy do rozwiązania, aniżeli po upływie tego czasu. Trudność polega przede wszystkim na tym, że sam proces wiązania wolnego azotu jest ściśle związany z życiem komórki i że na zewnątrz tej komórki odtworzyć go dotychczas nie można. Gdy badania dotyczą organizmów symbiotycznych, trudność jest jeszcze większa, ponieważ w wypadku tym mechanizm wiązania cząsteczkowego azotu jest wynikiem ścisłej współpracy rośliny motylkowej i bakterii. Jak wiadomo żaden z tych organizmów, bez współżycia z drugim, nie może wiązać wolnego azotu.

Przy omawianiu mechanizmu cząsteczkowego wiązania azotu na pierwszy plan wysuwają się trzy następujące zagadnienia: 1) Zagadnienie produktu wiązania wolnego azotu, czyli tego nieorganicznego związku, który jako pierwszy wchodzi w skład związków organicznych, łącząc się z α-ketokwasami. 2) Zagadnienie układu enzymatycznego, katalizującego proces wiązania cząsteczkowego azotu. 3) Rola czerwonego barwnika w brodawkach korzeniowych roślin motylkowych w procesie wiązania wolnego azotu.

KLUCZOWY PRODUKT WIĄZANIA WOLNEGO AZOTU

Zagadnienie produktu wiązania wolnego azotu łączy się ściśle z teorią mechanizmu wiązania wolnego azotu. Mamy takie dwie teorie: a) teoria utleniania cząsteczkowego azotu, b) teoria redukcji tego azotu. Teoria

utleniania jest ciągle tematem rozważań mikrobiologów i biochemików, oparta jest jednak na bardzo nikłych podstawach doświadczalnych i dlatego ma tylko bardzo nielicznych zwolenników. Teoria redukcyjna natomiast jest dzisiaj ogólnie przyjęta. Autorem jej jest Winogradski (1902). Winogradski badając produkty wiązania wolnego azotu przez *Clostridium pasteurianum* stwierdził obecność amoniaku *. Według niego amoniak powstaje z azotu cząsteczkowego, przyswojonego przez ten organizm a następnie zredukowanego.

Kostyczew i Ryskalczuk (1925) wykryli amoniak (i aminokwasy) w produktach wiązania wolnego azotu przez azotobaktera, a potwierdził to Winogradski (1930). Stwierdził on wydzielanie się amoniaku z czystej hodowli azotobaktera. Powolne wydzielanie się tego związku i jego występowanie przez wiele miesięcy wykluczały, wg Winogradskiego, możliwość pochodzenia amoniaku z rozkładu. Winogradski (1936) badał też brodawki korzeniowe roślin motylkowych świeżo odcięte od macierzystego korzenia i stwierdził, że wydzielają one znaczne ilości amoniaku; środki antyseptyczne nie hamowały tego wydzielania. Demolon i Dunez (1938) zaobserwowali pozytywną korelację pomiędzy czynnościami oddechowymi brodawek i stężeniem wydzielającego się z nich amoniaku. Z wyników tych badań Winogradski, a także Kostyczew wysnuli wniosek, że najbardziej prawdopodobnym sposobem wiązania cząsteczkowego azotu (przez organizmy symbiotyczne i niesymbiotyczne) jest stopniowa jego redukcja a najbardziej prawdopodobnym produktem wiązania wolnego azotu jest amoniak.

Teza Winogradskiego i Kostyczewa spotkała się z ostrą krytyką innych mikrobiologów. Wilson (1940) tłumaczył, że przy ówczesnych metodach badawczych trudno było odróżnić azot metaboliczny od azotu „juwenilnego", tzn. świeżo przez organizm związanego. Fiodorow natomiast (1948) był zdania, że wywiązujący się z brodawek korzeniowych amoniak mógł pochodzić z mocznika, zawsze obecnego w brodawkach.

Wokoło całego zagadnienia wywiązała się ożywiona dyskusja. Jednak dopiero wprowadzenie do badań biologicznych izotopów, a przede wszystkim ciężkiego azotu N^{15}, przyczyniło się do lepszego wyświetlenia tego zagadnienia. Badania te prowadzono głównie w pracowni Wilsona Wilson, 1940, Wilson, Burris i Coffe 1943, Wilson i Burris 1947, 1952, 1953) zarówno na organizmach symbiotycznych jak i samodzielnie żyjących. Przedstawiały się one w skrócie następująco: Wilson hodował azotobaktera na pożywce, w której źródłem azotu były

* W tym samym czasie Hilman i Willis wykryli również amoniak w produktach wiązania wolnego azotu u *Clostridium pasteurianum* (cyt. wg Winogradski, Mikrobiologia gleby. PWRiL. 1953).

różne związki azotowe nacechowane N^{15} a mianowicie: amoniak, mocznik, azotany i azotyny. Stwierdził on, że tylko amoniak, a w mniejszym stopniu także mocznik były pobierane przez organizm w całości i natychmiast. Azot izotopowy odkładany był głównie w kwasie glutaminowym, znacznie zaś słabiej w kwasie asparaginowym i alaninie. Według Wilsona, dwa ostatnie aminokwasy mogły powstawać z kwasu glutaminowego na skutek procesów transaminacyjnych.

W innych doświadczeniach Wilson badał wpływ amoniaku, azotanów i azotynów na energię wiązania wolnego azotu przez azotobaktera i stwierdził, że tylko amoniak i związki, które przy rozkładzie uwalniają amoniak, hamują to wiązanie całkowicie i bardzo szybko. Azotany i azotyny natomiast wywołują takie hamujące działanie dopiero po pewnym czasie. Wilson wysnuł ze swoich badań wniosek, że najwidoczniej amoniak jest tym związkiem, który najłatwiej zastępuje organizmowi azot cząsteczkowy.

Badania prowadzone przez Wilsona i jego współpracowników nad *Clostridium pasteurianum* wykazały, że w przypadku braku kwasów trójkarboksylowych, organizm ten gromadził duże ilości związków azotowych, wśród których dominował amoniak. Ważny wydaje się również fakt, że przy dostarczeniu tej bakterii zarówno azotu cząsteczkowego jak i amoniakalnego, nacechowanych N^{15}, w kwasie glutaminowym odnajdowano jednakowe ilości tego izotopu.

Z pomocą chromotografii bibułowej stwierdzono, że największa ilość pobranego przez system: rośliny motylkowe + *Rhizobium* azotu gromadziła się w kwasie glutaminowym, mniej było go w kwasie asparaginowym i w alaninie.

Te zbieżne wyniki badań prowadzonych na organizmach symbiotycznych i żyjących samodzielnie, skłoniły badaczy amerykańskich do zrewidowania swojego stanowiska. Przyznali oni, że istotnie teza Winogradskiego i Kostyczewa była słuszna, tzn. że amoniak jest najbardziej prawdopodobnym kluczowym produktem wiązania wolnego azotu.

Virtanen (1931), badając związki azotowe wydzielane z brodawek korzeniowych roślin motylkowych w okresie ich największej aktywności, stwierdził wśród nich nieduże, ale stałe ilości kwasu oksyiminobursztynowego. Kwas ten mógł, wg Virtanena, powstać tylko z syntezy hydroksylaminy z kwasem szczawiooctowym * wg następującego równania:

$$COOH-CO-CH_2-COOH + NH_2OH \rightarrow COOH-C(NOH)-CH_2-COOH$$

* Kwas szczawiooctowy produkowany jest przez rośliny motylkowe w większej ilości niż przez inne rośliny; kwas ten reaguje niezwykle szybko z hydroksylaminą.

Kwas ten ulega następnie redukcji dając kwas asparaginowy, którego obecność w produktach wydzielania brodawek została również przez Virtanena stwierdzona. Blom (1931) znalazł także w produktach wiązania wolnego azotu azotobaktera hydroksylaminę, a Enders (1935) potwierdził to. Na tej podstawie Virtanen wysunął tezę, że hydroksylamina a nie amoniak jest kluczowym produktem wiązania wolnego azotu zarówno u organizmów samodzielnie żyjących jak u symbiotycznych. Jednak potem Virtanen sam wycofał swoją tezę, ponieważ stwierdził w produktach wydalanych z brodawek obecność nie tylko kwasów oksyiminobursztynowego i asparaginowego, lecz także kwasu glutaminowego. Jak wiadomo, kwas α-ketoglutarowy reaguje z hydroksylaminą bardzo powoli, bardzo energicznie natomiast z amoniakiem. Na tej podstawie Virtanen (1938), uznał zarówno amoniak, jak i hydroksylaminę za kluczowe produkty procesu wiązania wolnego azotu. Pogląd Virtenena był przez długi czas kwestionowany przez różnych mikrobiologów i biochemików, jednak w ostatnich latach znalazł on dodatkowe uzasadnienie. Mianowicie Suzuki (1954) i Taniguchi (1955) stwierdzili obecność systemu reduktaz (w organizmach zdolnych do wiązania wolnego azotu), katalizujących redukcję hydroksylaminy do amoniaku. Aktywność tych reduktaz znacznie zmniejszała się, gdy źródłem azotu tych organizmów był nie azot cząsteczkowy, lecz azot związany. Przeciwko uznaniu hydroksalaminy za kluczowy produkt wysuwany jest zarzut jej toksyczności dla organizmów. Z tego też powodu badania nad tym związkiem, jako źródłem azotu dla ustrojów wiążących wolny azot, są bardzo trudne. Trudność polega także na tym, że przy dłużej trwających doświadczeniach hydroksylamina ulega rozkładowi na amoniak i wolny azot, co może prowadzić do fałszywych wniosków. Pomimo to badacze (Wilson, Burris 1953, Fowden 1958 a także i Virtanen) przyjęli kompromisowe stanowisko uznając, że kluczowym produktem biologicznego wiązania azotu mogą być zarówno amoniak jak hydroksalamina. Hydroksalaminę można zatem uważać za kluczowy związek, gdy w ubocznych reakcjach łączy się ona z jakimś akceptorem np. z kwasem szczawiooctowym. Jeżeli zaś ulega redukcji, to stanowi związek pośredni w procesie wiązania wolnego azotu i jedynym kluczowym związkiem jest amoniak. Oprócz hydroksalaminy także hydrazyna wymieniana jest jako prawdopodobny pośredni związek w procesie wiązania N_2. Związek ten jest również toksyczny dla organizmów i dlatego prowadzenie badań z nim, jako ze źródłem azotu, nastręcza wiele trudności. Wykazano jednak, że N^{15} hydrazyny odkładany jest nie w kwasie glutaminowym lecz w innych aminokwasach. Wysnuto stąd wniosek, że hydrazyna nie leży na bezpośrednim szlaku pomiędzy N_2 i NH_3 (Fowden 1958).

Proces rozbicia przez organizm biernej cząsteczki atmosferycznego

azotu nie jest jasny. Wymieniane są cztery następujące możliwości (Wilson i Burris 1947):

1. Jonizacja: $N_2 \rightarrow N_2^+$
2. Dysocjacja: $N_2 \rightarrow 2N$

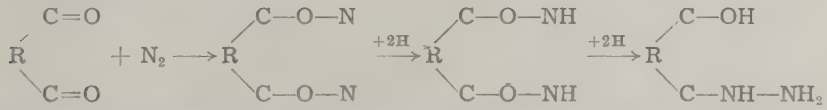
} a potem redukcja lub utlenienie

3. Bezpośrednia redukcja: $N_2 \rightarrow HN=NH$
4. Redukcja i hydratacja: $N_2 \rightarrow HON=NOH$.

SYSTEM ENZYMATYCZNY PROCESU WIĄZANIA WOLNEGO AZOTU

Prianisznikow pierwszy zwrócił uwagę na doniosłość badań związanych z systemem enzymatycznym organizmów uzdolnionych do korzystania z cząsteczkowego azotu. Według jego mniemania, poznanie tego układu mogłoby stanowić przykład dla techniki, która obecnie wiąże wolny azot z olbrzymim nakładem energii w przeciwieństwie do żywych organizmów.

W roku 1934 Burk nazwał cały czynny w tym procesie układ enzymatyczny azotazą, wyróżniając w niej specyficzny enzym nitrogenazę, wspomaganą przez jony Ca, Mo i V. Fiodorow (1946) wyróżnia w cząsteczce nitrogenazy trzy charakterystyczne grupy: karboksylową, aminową i karbonilową. Ta ostatnia łączy się, wg przypuszczeń Fiodorowa, z cząsteczką azotu za pośrednictwem tlenu, wg następującego równania:



Związek ten ulega redukcji dając pochodną typu hydrazyny. W dalszym toku odłącza i uwalnia się nitrogenaza, hydrazyna natomiast pod wpływem redukcji i uwodnienia tworzy amoniak i hydroksylaminę:

$$H_2N-NH_2 \xrightarrow{+2H} 2NH_3$$

$$H_2N-NH_2 \xrightarrow{+H_2O} NH_3 + NH_2OH$$

W procesie wiązania cząsteczkowego azotu bierze udział jeszcze jeden enzym, mianowicie hydrogenaza, która specyficznie aktywuje cząsteczkowy wodór. Enzym ten został odkryty w 1931 r. Mniej więcej w tym samym czasie stwierdzono, że wodór cząsteczkowy hamuje wiązanie wolnego azotu przez azotobaktera i przez rośliny motylkowe. Nasunęło to przypuszczenie, że, być może, w organizmach wiążących wolny azot czynna jest hydrogenaza. Istotnie, w 1943 r. odkryto obecność hydrogenazy w azotobakterze, a potem w *Clostridium pasteurianum* (Lee i Wilson 1943). Wyciągnięto stąd wniosek, że każdy organizm zawierający hydrogenazę byłby równocześnie uzdolniony do wiązania cząsteczkowego azotu. Wniosek ten zyskał silniejsze uzasadnienie, gdy w 1947 r. Kamen i Gest stwierdzili, że azot cząsteczkowy hamuje wydzielanie wodoru na świetle u *Rhodospirillum rubrum* (gatunek należący do grupy

bakterii uzdolnionych do korzystania z cząsteczkowego azotu a zarazem do fotosyntezy). Z czasem odkryto liczne organizmy zawierające hydrogenazę i równocześnie mające zdolności do wiązania wolnego azotu (Green, Alexander i Wilson 1953). Udało się też wyosobnić hydrogenazę z azotobaktera i z *Clostridium* oraz otrzymać ją w czystym stanie. Okazało się, że jest to molibdenoflawoproteid (Shug, Hamilton i Wilson 1956). Odkrycie to ma wielkie znaczenie przede wszystkim dlatego, że wyjaśnia rolę molibdenu w procesie wiązania wolnego azotu, a także i dlatego, że reduktazy roślinne są również metaloflawoproteidami. Odkrycie hydrogenazy jako jednego z enzymów układu azotazy podkreślałoby jedność budowy enzymatycznej u organizmów uzdolnionych do wiązania wolnego azotu. Jedność tę podważa jednak niemożność wykrycia hydrogenazy w brodawkach korzeniowych roślin motylkowych, jakkolwiek hamowanie wiązania wolnego azotu przez cząsteczkowy wodór jest u tych organizmów szczególnie silne. Wilson zawsze był jednak zdania, że niemożność wykrycia tego enzymu nie oznacza bynajmniej jego absolutnej nieobecności w systemie: rośliny motylkowe+*Rhizobium*. Według niego enzym ten jest tak silnie związany z procesem wiązania wolnego azotu, że aktywność jego natychmiast zanika, gdy tylko czynne brodawki korzeniowe odetniemy od macierzystego korzenia. Przewidywania Wilsona sprawdziły się, bo w roku 1957 odkryto hydrogenazę w brodawkach korzeniowych soi (Hocht, Little i Burris 1957). Odkrycia tego dokonano z pomocą deuterium. Badania dalsze wykazały, że najwyższą aktywność hydrogenazy posiadają brodawki nietknięte, w skrawkach ich aktywność ta maleje i zanika zupełnie w brodawkach roztartych. Zaobserwowano też, że aktywność hydrogenazy jest wprost proporcjonalna do stężenia czerwonego barwnika w brodawkach. W okresie, kiedy barwnik czerwony brodawek zmienia się w zielony, a więc wtedy, kiedy energia wiązania wolnego azotu słabnie, zmniejsza się równocześnie aktywność hydrogenazy. Należy zatem rozpatrzyć teraz rolę, jaką spełnia w procesie wiązania wolnego azotu hydrogenaza i nitrogenaza. Według przypuszczeń Shug, Hamiltona i Wilsona (1956) nitrogenaza chemicznie adsorbuje azot cząsteczkowy a hydrogenaza katalizuje jego redukcję. Badacze przypuszczają, że zjawisko hamowania procesu wiązania wolnego azotu przez cząsteczkowy wodór należy tłumaczyć redukcją przezeń nitrogenazy, a w konsekwencji blokowaniem miejsca adsorpcji wolnego azotu. Są to jednak tylko domysły nie poparte jeszcze doświadczeniem. Widzimy więc, że problem systemu enzymatycznego, katalizującego proces wiązania wolnego azotu, jest jeszcze daleki od całkowitego wyjaśnienia. Między innymi wciąż jeszcze nie umiemy wytłumaczyć sobie faktu, że wodór cząsteczkowy nie hamuje wiązania wolnego azotu u *Clostridium pasteurianum*, jakkolwiek organizm

ten zawiera hydrogenazę. Prowadzone są też badania nad wyodrębnieniem systemu enzymatycznego z komórek azotobaktera i z innych tego typu organizmów. Badania te, jak dotąd, nie dały jeszcze zadowalających wyników.

ROLA CZERWONEGO BARWNIKA W BRODAWKACH KORZENIOWYCH

Znajdujący się w brodawkach czerwony barwnik jest hemoproteidem bardzo podobnym do hemoglobiny krwi zwierząt kręgowych; związki te różnią się między sobą składem aminokwasowym. Barwnik ten syntetyzowany jest w brodawkach tylko wtedy, gdy czynny szczep *Rhizobium* zakazi właściwą sobie roślinę motylkową. Stężenie tego barwnika w brodawkach jest wprost proporcjonalne do energii wiązania wolnego azotu przez system: roślina+*Rhizobium*. W okresie słabnącej energii wiązania wolnego azotu barwnik ten stopniowo zamienia się w zieloną choleglobinę, a w końcu w brązową methemoglobinę i w koproporfirynę. Barwniki te zlokalizowane są w tej części tkanki brodawek, w której największa ilość *Rhizobium* znajduje się w formie bakteroidów. Heumann (1952) przebadał ponad 500 sztuk brodawek grochu i wszędzie znalazł taką zależność. Nie stwierdzono natomiast obecności „leghemoglobiny" (termin wprowadzony dla określenia czerwonego barwnika brodawek przez Virtanena) ani w samych *Rhizobium*, ani też w roślinach motylkowych nie zakażonych. Nie stwierdzono go też w azotobakterze, w *Clostridium pasteurianum*, w *Nostoc muscorum* i w innych mikroorganizmach uzdolnionych do wiązania cząsteczkowego azotu. Brak go też w brodawkach roślin niemotylkowych jak np. olchy, oliwnika i innych.

Virtanen (1938) badając chemizm czerwonego barwnika brodawek zwrócił uwagę na jego przypuszczalny udział w procesie wiązania wolnego azotu. Wysunął przypuszczenie, że barwnik ten mógłby spełniać rolę nosiciela tlenu dla bakterii uwięzionych w brodawkach. Smith (1948) jednak zaprzeczył tym przypuszczeniom, ponieważ wg jego badań brodawki czynne i nieczynne, a więc nie syntetyzujące czerwonego barwnika, nie różnią się intensywnością procesów oddechowych. Późniejsze badania Burrisa i Wilsona (1952) potwierdziły koncepcję Virtanena. Badacze ci stwierdzili, że czerwony barwnik wyodrębniony z brodawek stymuluje procesy oddechowe *Rhizobium* w czasie ich rozwoju poza rośliną. Według Wilsona (1958) zjawisko hamowania wiązania wolnego azotu przez tlenek węgla można wytłumaczyć tylko zablokowaniem dostępu tlenu do bakterii. Rozważając to zagadnienie Wilson przypuszcza, że rolę nosiciela tlenu dla bakterii samodzielnie żyjących, jak azotobakter czy *Clostridium*, spełniają różne hematynowe połączenia zawsze obecne w tych ustrojach. Różne stężenia tych połączeń w różnych organizmach

tłumaczy nam dlaczego wiązanie wolnego azotu przez te ustroje jest hamowane przez tlenek węgla w różnych jego stężeniach.

Rolę leghemoglobiny w procesie oddychania starano się wyjaśnić przez porównawcze badania nad barwnikiem oddechowym *Rhizobium*. Appleby i Bergersen (1958) stwierdzili, że *Rhizobium* w postaci samodzielnych pałeczek syntetyzuje wszystkie trzy cytochromy: *a*, *b* i *c*, po przejściu natomiast w formę bakteroidalną zanika cytochrom *a*. Autorzy tych badań nie umieją jeszcze wytłumaczyć tego zjawiska. Być może, cytochrom *a* zostaje wtedy zastąpiony przez jakiś inny barwnik oddechowy.

Wilson (1958) badał spektrofotometrycznie wpływ cząsteczkowego azotu na leghemoglobinę wyizolowaną z brodawek korzeniowych roślin motylkowych. Stwierdził, że widmo absorpcyjne oksyhemoglobiny zostaje zastąpione przez widmo absorpcyjne charakterystyczne dla methemoglobiny. Tak więc azot cząsteczkowy utlenia czerwony barwnik brodawek. Wilson zapewnia, że możliwość zanieczyszczenia azotu drobinowego tlenem była w jego doświadczeniach wykluczona. Powyżej omówione badania nad czerwonym barwnikiem brodawek wskazują na jego rolę w procesie wiązania wolnego azotu, jednak zagadnienia tego jeszcze nie rozwiązują. Dlatego to wielu mikrobiologów neguje udział leghemoglobiny w procesie wiązania wolnego azotu. Jako argument wysuwają oni fakt, że *Rhizobium* w samodzielnej fazie swego rozwoju nie wiąże wolnego azotu po dostarczeniu im hemoglobiny, pochodzącej z brodawek korzeniowych roślin motylkowych. Pierwsze, rzekome pozytywne próby musiał Virtanen odwołać, gdy do badań zaczęto stosować N^{15}. Fiodorow, również negujący udział leghemoglobiny w procesie wiązania wolnego azotu, wysuwa inny argument, a mianowicie ten, że rośliny niemotylkowe również uzdolnione do wiązania atmosferycznego azotu (jak np. olcha), nie syntetyzują tego barwnika. Virtanen odpierał ten zarzut tłumacząc, że brodawki korzeniowe roślin motylkowych mają inny skład aminokwasowy niż brodawki olchy. W brodawkach olchy dominuje cytrulina (a brak jest kwasów glutaminowego i asparaginowego), podczas gdy w brodawkach roślin motylkowych nie ma cytruliny, natomiast w dużej ilości syntetyzowane są kwas glutaminowy i asparaginowy. Jednak sam Virtanen (Miettinen i Virtanen 1952) przyznał potem, że cytrulina nie jest aminokwasem specyficznym dla procesów biologicznego wiązania wolnego azotu przez olchę, ponieważ produkowana jest nie tylko w brodawkach, lecz także i w korzeniach tych roślin, i to nie tylko wtedy gdy roślina pobiera wolny azot, ale także wtedy gdy źródłem azotu są jego związki.

Pomimo tych sprzecznych badań w zjawisku tym muszą nas zastanawiać następujące fakty: 1) Tylko rośliny motylkowe syntetyzują czerwony barwnik i to jedynie wówczas, gdy aktywny szczep *Rhizobium* zakazi

właściwą sobie roślinę motylkową. 2) Barwnik ten zamienia się stopniowo w barwnik zielony przy równoczesnym zmniejszeniu się energii wiązania wolnego azotu i zanika zupełnie wtedy, gdy proces ten jest ukończony. 3) Aktywność hydrogenazy jest wprost proporcjonalna do stężenia tego barwnika w brodawkach. 4) Tlenkowęglowa hemoglobina hamuje wiązania wolnego azotu w systemie: rośliny motylkowe+*Rhizobium*, podobnie jak tlenkowęglowa hemoglobina krwi hamuje rozprowadzenie tlenu w organizmie zwierząt. 5) Azot cząsteczkowy utlenia oksyhemoglobinę brodawek do methemoglobiny. 6) Produkcja tego barwnika w brodawkach uzależniona jest od obecności soli żelaza i miedzi w pożywce roślin motylkowych, podobnie jak i produkcja czerwonego barwnika krwi w organizmie zwierząt.

Z tego ogólnego przeglądu badań nad mechanizmem wiązania wolnego azotu widzimy, jak wiele jeszcze zagadnień czeka na rozwiązanie. Wspaniałe metody opracowane przez fizjologów dla badań nad fotosyntezą, a w szczególności metody badań pozakomórkowych, będą mogły zapewne być również zastosowane do badań nad symbiotycznym i niesymbiotycznym wiązaniem wolnego azotu. Jednak do takich badań muszą włączyć się mikrobiologowie wraz z biochemikami i fizjologami, ponieważ tylko badania zespołowe mogą dać pożądane wyniki.

LITERATURA

Applely C. A., Bergersen F. J., 1958: Cytochrom of *Rhizobium*. *Nature*, **182**: 1174.

Blom J., 1953: Ein Versuch die chemischen Vorgänge bei der Assimilation des molekularen Stickstoffs zu erklären. *Zentr. Bakter. II*, **84**: 1.

Burk D., 1934: Azotase and nitrogenase in *Azotobacter*. *Ergebnisse Enzymforsch.*, **3**: 23.

Burris R. H., Wilson P. W., 1952: Effect of hemoglobin on the respiration of Rhizobia. *Biochem. J.*, **51**: 90.

Burris R. H., Orcutt F. S., Umbreit W. W., cyt. wg Wilson W., *Adv. Enzymol.*, **13**: 345, 1952.

Burris R. H., 1956: Studies on the mechanism of biological nitrogen fixation „Symp. on inorganic nitrogen metabolism".

Démolon A., Duner A., 1938: Symbiose bactérienne et culture de Légume. *Ann. agronom.*, **8**: 220.

Enders G., 1935: Zur Kentnis der Stickstoff-assimilierenden Bakterien. *Liebigs Annales*, **518**: 109.

Fiodorow M. W., 1946: Chimizm fiksaciji azota atmosfiery azotobaktierom. *Mikrobiołogija*, **15**: 6.

Fiodorow M. W., 1948: Biołogiczeskaja fiksacija azota atmosfiery. *Izd. A. K. N. SSSR*, Moskwa.

Fowden L., 1958: Utilization of inorganic nitrogen sources by plants. *Nature*, **182**: 1197.

Green M., Alexander M., Wilson P. W., 1953: Hydrogenase in nitrogenase-deficient *Azotobacter* mutants. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **82**: 351.

Heumann W., 1952: Über d. Wesen und Bedeutung der Bacteroide in den Wurzelknöllchen der Erbse. *Naturwissenschaften*, **39**: 66.

Hocht E. G., Little H. N., Burris R. H., 1957: Hydrogen evolution from soybean root-nodules. *Nature*, **179**: 431.

Kamen M. D., Gest H., 1949: Evidence for a nitrogenase system in the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *Science*, **109**: 560.

Kostyczew S., Ryskalczuk A., 1925: Les produits de la fixation d'azote atmospherique par l'*Azotobacter agile*. *C. R. Acad. Sci.* **180**.

Lee S. R., Wilson P. W., 1943: Hydrogenase and nitrogen fixation by *Azotobacter*. *J. Biol. Chem.*, **151**: 377.

Miettinen J. K., Virtanen A. I., 1952: The free aminoacids in the leaves, roots, and root-nodules of the alder (*Alnus*), *Physiol. plant.*, **5**: 540.

Shug A., Hamilton P. B., Wilson P. W., 1956: A symposium on inorganic nitrogen-fixation, Baltimore, J. Hopkins Press.

Smith J, D., 1948: Hemoglobin and the oxygen uptake of leguminous root-nodules. *Bioch. J.*, **44**: 5.

Suzuki B., Sakaru Suzuki; 1954: Hydroxylamine reduction and hydrasine oxidation. *Sci. Rep. Tohoku Univ.*, **20**: 195. (cyt. wg *Encyklopedia of plant physiol.*, 1958, **8**: 37).

Taniguchi S. H., Mitsui, Nakamura K., Egami F., 1955: Hydroxylamine reductase. *Ann. Acad. Sci. Fenn. Ser. A.*, **2**: 200.

Virtanen A. I., Synnöve v. Hansen, Karström, 1931: Untersuchungen über die Leguminosen Bacterien und Pflanzen. *Bioch. Zeits.* **258**: 106.

Virtanen A. I., 1938: Cattle fodder and human nutrition. Cambridge, University Press.

Wilson P. W., 1940: The symbiotic nitrogen fixation. Madison.

Wilson P. W., Burris R. H., Coffe W. B., 1943: Hydrogenase and symbiotic nitrogen fixation. *J. Biol. Chem.*, **147**: 475.

Wilson P. W., Burris R. H., 1947: The mechanism of biological nitrogen fixation. *Bact. Rev.*, **11**: 41.

Wilson P. W., Burris R. H., 1952: The comparative biochemistry of nitrogen fixation. *Enzymol.*, **13**: 345.

Wilson P. W., Burris R. H., 1953: Biological nitrogen fixation *Annal. Rev. Microbiol.*, **7**: 415.

Wilson P. W., 1958: w: Encyclopedia of plant physiol., **8**: 31.

Winogradski S., 1902: *Clostridium pasteurianum*, sa morphologie et ses caractères de ferment butirique. *Zentr. Bakter. II*, **2**: 43 (cyt. wg Winogradski S, Mikrobiologia gleby, PWRiL, 1953: 348).

Winogradski S., 1930: Sur la synthèse de l'ammoniac par les *Azotobacter* du sol. *C. R. Ac. Sci.* (cyt. Winogradski S., Mikrobiologia gleby, PWRiL, 1953).

Winogradski S., 1930: Recherches sur les bacteries radicicoles des Legumineuse. *Ann. Inst. Pasteur*. (cyt. wg Winogradski S., Mikrobiologia gleby. PWRiL, 1953: 728).

A. Nowotny-Mieczyńska

THE MECHANISM OF BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION

Summary

A review has been given of the following questions:

1. The nature of the key-intermediate in nitrogen fixation. The main theories are: a) ammonia — the key-intermediate, b) hydroxylamine as an intermediate, c) other suggested intermediates.

2. The enzymatic mechanism of nitrogen-fixation, with special reference to the occurence of hydrogenase in the azotase enzyme-system.

3. The role of nodular pigments in the nitrogen-fixing process of the rhizobia — legume complex: the facts of major interest concerning the occurence and possible function of leghemoglobin in nodules.

DYSKUSJA

J. Ziemięcka

Jak rozwijają się obecnie badania nad systemem enzymatycznym komórek rozerwanych ultradźwiękami. Jak długo są czynne w tych warunkach systemy enzymatyczne?

Twórcą „teorii amoniakalnej" wiązania wolnego azotu był Winogradski. Stwierdził on (w 1894 r.), że amoniak jest produktem tego procesu u *Clostridium*.

Odpowiedź autorki

Prace nad wiązaniem azotu przy zastosowaniu metody rozrywania komórek bakteryjnych z pomocą ultradźwięków są jeszcze bardzo fragmentaryczne i nie dały ciekawszych wyników.

Obecność hemoglobiny stwierdzono nie tylko u drożdży, lecz także i u niektórych szczepów *Penicillium*.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1959, 8 : 283—287

M. Fiuczek

WIĄZANIE AZOTU ATMOSFERYCZNEGO W CZYSTYCH KULTURACH *STREPTOMYCES ALNI*

Z Katedry Fizjologii Roślin Uniwersytetu Warszawskiego

WSTĘP

W roku 1896 Hiltner (wg Baldwin, Fred i Mc Coy 1932) stwierdził, że siewki *Alnus glutinosa* hodowane w jałowej ziemi bez związków azotowych, a następnie szczepione materiałem z brodawek olchy wykazały po roku hodowli zdrowy i obfity przyrost, a rośliny nie szczepione w tych samych warunkach były małe i wykazywały objawy głodu azotowego.

Z badań Virtanena (1936) wynika, że w kulturach piaskowych olcha szczepiona materiałem z brodawek korzeniowych z tego drzewa bez nawożenia azotowego rozwijała się lepiej niż nie szczepiona z dodatkiem azotanu amonu. Virtanenowi i współpracownikom nie udało się wyodrębnić z brodawek olchy organizmu, któryby wiązał azot atmosferyczny; do szczepień stosowali oni roztarte brodawki olchy.

Plotho (1941) szczepiła jałowo wyhodowane siewki olchy wyodrębnionym z brodawek *Alnus incana* szczepem *Streptomyces;* na korzeniach tych olch powstawały brodawki. Przy końcu drugiego okresu wegetacyjnego stwierdziła, że jedna roślina związała z powietrza 63,44 mg azotu. W 1940 r. Plotho przeprowadziła doświadczenia nad wiązaniem azotu atmosferycznego przez wyodrębniony przez nią szczep *Streptomyces* w czystej kulturze i stwierdziła, że jest on zdolny do związania 5 mg azotu atmosferycznego na 100 ml pożywki w czasie 28 dni w temperaturze pokojowej.

Doświadczenie nad wiązaniem azotu w czystych kulturach na pożywce stosowanej przez Plotho zostało powtórzone przeze mnie z wyodrębnionym z brodawek olchy własnym szczepem *Streptomyces.*

BADANIA WŁASNE

Użyty do doświadczeń w tej pracy szczep *Streptomyces* wyodrębniony został z brodawek olchy (*Alnus glutinosa*) w czerwcu 1953 r. na pożywce o składzie: 1,25% agaru, 2% glikozy, 1% peptonu, woda wodociągowa, temperatura hodowli=22°.

Odcięte od korzenia olchy brodawki myto w wodzie destylowanej, po osuszeniu w bibule umieszczano je na 2 minuty w 80-procentowym alkoholu etylowym. Wyodrębniono z brodawek promieniowiec o koloniach szarych, pofałdowanych na powierzchni, wrastających w agar. Grubość strzępek wahała się od 0,5 do 1,5 mikrona — konidii na tym podłożu *Streptomyces* nie tworzył; dopiero na agarze ze skrobią wytworzył konidia barwy zielonej, owalne i cylindryczne.

Wstępne doświadczenie zostało przeprowadzone na pożywce o następującym składzie: K_2HPO_4 — 0,8 g, KH_2PO_4 — 1,1 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,2 g, cytrynian żelaza 0,005 g, NaCl — 0,05 g, $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ — 0,2 g, glikoza — 10 g, skrobia — 1 g, roztwór Hoaglanda A-Z — 1 ml/litr pożywki, woda destylowana — 1 litr, *pH* pożywki — 6,4; wszystkie substancje nieorganiczne były „*pro analysi*" lub „*purissimum*", przeważnie produkcji zagranicznej, skrobia i glikoza produkcji krajowej.

Doświadczenie przeprowadzono w kolbach 700 ml Pyrex w 4 powtórzeniach; w kolbie był 500 ml pożywki. Po zaszczepieniu inkubacja w temperaturze 23° trwała 3 tygodnie. Wzrost początkowo był słaby na dnie i przy ściankach kolby, po 2 tygodniach obfity, ale bardzo śluzowaty; konidia nie wytwarzały się. Po tym czasie wykonano oznaczenie azotu całkowitego metodą Kjeldahla — wynik był negatywny, wiązania azotu w tych warunkach nie stwierdzono.

Drugie doświadczenie w 3 powtórzeniach zostało wykonane na pożywce o tym samym składzie związków nieorganicznych, lecz bez glikozy i roztworu A-Z, a ilość skrobi wynosiła 10 g na litr pożywki (użyta do doświadczenia skrobia pochodziła z Hurtowni Odczynników w Gliwicach), *pH* — 6,4; inkubacja w temperaturze 23°.

Po tygodniu rozpoczął się obfity wzrost na powierzchni w postaci wysepek a następnie pokrył całą powierzchnię pożywki. Na całej powierzchni wytworzyły się zielone, bardzo liczne konidia, wzrost na dnie był bardzo słaby, końcowe *pH* hodowli wynosiło 6,8. Po 30 dniach inkubacji wykonano oznaczenia azotu całkowitego jak poprzednio i znaleziono w tych warunkach średnio 11,06 mg azotu związanego z powietrza w 500 ml hodowli *Streptomyces*. To samo doświadczenie powtórzone w temperaturze pokojowej (około 20°) w ciągu 30 dni wykazało obfity wzrost i wytwarzanie konidii. Ilość azotu atmosferycznego związanego wyniosła średnio 12,2 mg na 500 ml hodowli.

Trzecie doświadczenie wykonane zostało na pożywce o tym samym składzie w dwu seriach: seria A — z glikozą, seria B — z glikozą + roztwór Hoaglanda 1 ml/litr, *pH* pożywki wynosiło 6,3. Obydwie serie trzymane były w temperaturze pokojowej.

Wzrost w obydwu seriach w ciągu 30 dni hodowli był bardzo słaby na dnie, przy ściankach kolby i na powierzchni. Konidia nie tworzyły się. Na pożywce z glikozą, w tych warunkach *Streptomyces* nie wiąże azotu atmosferycznego.

Czwarte doświadczenie wykonano ze skrobią firmy Schering. Skrobia ta jest prawie całkowicie rozpuszczalna w wodzie. Doświadczenie to wykonano w takich warunkach jak doświadczenie drugie, ze skrobią gliwicką. Oznaczenie azotu całkowitego po 32 dniach hodowli w temperaturze 23° dało wynik negatywny. Okazuje się, że asymilacja azotu atmosferycznego przez *Streptomyces alni* odbywa się tylko na pożywce z pewnymi gatunkami skrobi. Skrobia gliwicka umożliwia wiązanie azotu atmosferycznego, zaś skrobia z firmy Schering — nie.

W celu zbadania tej właściwości skrobię gliwicką poddano następującemu zabiegowi:

50 g skrobi w 4 litrach wody destylowanej ogrzano do 100° i dodano 5 litrów alkoholu etylowego 96-procentowego, następnie odstawiono do temperatury + 3° i po ochłodzeniu i opadnięciu wytrąconej skrobi na dno kolby, wirowano przy 4000 obrotów na minutę. Odwirowany alkoholowo-wodny roztwór stężono w temperaturze około 45° do objętości około 300 ml i dodano do niego 400 ml alkoholu etylowego 96-procentowego. Wytrąconą skrobię powtórnie odwirowano przy 12 000 obrotów na minutę. Po oddzieleniu skrobi, alkoholowo-wodny roztwór ponownie stężono w temperaturze około 45° do około 20 ml, po czym wstawiono do temperatury +3° W wyniku otrzymano substancję krystaliczną o zabarwieniu kremowo-żółtym. Substancję tę użyto do doświadczeń.

Doświadczenie piąte przeprowadzano w kolbach 700 ml Pyrex jak poprzednio, lecz do kolby dawano 200 ml pożywki. Wykonano 3 serie w trzech powtórzeniach.

I seria — pożywka podstawowa + skrobia gliwicka

II seria — pożywka podstawowa + skrobia Schering + substancja wyodrębniona ze skrobi w ilości 30 µg na 1 ml pożywki

III seria — pożywka podstawowa + glikoza + substancja wyodrębniona ze skrobi gliwickiej w ilości 30 µg na 1 ml pożywki.

Hodowla w temperaturze 23° trwała 32 dni. W serii I wzrost był obfity na powierzchni pożywki i wytworzyły się konidia. W serii II wzrost dość obfity, lecz słabszy niż w serii I, konidia wytworzyły się. W serii III wzrost bardzo słaby, denny, przy ściankach kolby i na powierzchni; konidia nie wytworzyły się.

Oznaczenie azotu całkowitego wykazało w serii I — 4,53 mg azotu związanego z powietrza, w serii II — 2,3 mg azotu związanego z powietrza, zaś w serii III nie stwierdzono wiązania azotu z powietrza.

Ponieważ, jak się następnie okazało, w substancji oddzielonej od skrobi obok substancji organicznej znajdowała się i nieorganiczna, spopielono więc obydwie skrobie. Znaleziono w 1 g skrobi Schering 18,4 mg popiołu, a w 1 g skrobi gliwickiej 6,8 mg popiołu. Wykonano analizę jakościową przy pomocy spektrografu. W popiele skrobi Schering znaleziono (orientacyjnie wg intensywności prążków) w większej ilości potas i sód, mało magnezu, glinu, wapnia, żelaza i miedzi. W popiele skrobi gliwickiej, potasowce występowały w mniejszej ilości niż w popiele skrobi Schering, natomiast więcej było magnezu, a ilość pozostałych pierwiastków taka sama jak w popiele skrobi Schering. Poza tym w popiele skrobi gliwickiej stwierdzono występowanie cynku. Molibdenu i wanadu nie wykryto w żadnym popiele.

Wykonano więc doświadczenie z popiołem skrobi gliwickiej w celu zbadania jego aktywności.

Doświadczenie to przeprowadzono w trzech seriach i w trzech powtórzeniach w warunkach takich jak doświadczenia poprzednie z wyodrębnioną substancją ze skrobi gliwickiej.

I seria — pożywka podstawowa nieorganiczna + skrobia gliwicka

II seria — pożywka podstawowa nieorganiczna + skrobia Schering + popiół ze skrobi gliwickiej w ilości 100 µg na 1 ml pożywki.

III seria — pożywka podstawowa nieorganiczna + glikoza + popiół ze skrobi gliwickiej w ilości 100 µg na 1 ml pożywki.

Doświadczenie przeprowadzono w temperaturze 23° w ciągu 32 dni. Dodany do kolb z pożywką popiół nie rozpuszczał się całkowicie.

W I serii wzrost bardzo obfity był na całej powierzchni pożywki i bardzo silne wytwarzanie konidii. W serii II wzrost dość obfity, lecz konidia praktycznie nie wytworzyły się. W III serii wzrost tylko na dnie kolby i bardzo słaby na powierzchni i zupełny brak konidii.

Oznaczenie azotu całkowitego wykazało: w I serii średnio 4,8 mg azotu związanego z powietrza, w II serii średnio 2,23 mg azotu związanego z powietrza, w III serii wiązania azotu z powietrza nie było.

DYSKUSJA

Zadaniem tej pracy było ustalenie warunków doświadczenia, w których wiązanie azotu atmosferycznego w czystych kulturach *Streptomyces alni* mogłoby się odbywać. Próby dodawania wyciągów wodnych z korzeni roślin symbiotycznych do pożywek, na których przeprowadzano doświadczenia nad wiązaniem wolnego azotu atmosferycznego przez mikroorganizmy symbiotyczne dały wynik negatywny. Wodne wyciągi korzeni zawierały takie ilości azotu, które zaspokajały wymagania azotowe mikroorganizmów hodowanych na pożywkach z ich dodatkiem.

Ekologiczne warunki, w jakich znajdują się symbiotyczne mikroorganizmy w brodawkach sugerują niewątpliwy udział skrobi w wiązaniu azotu atmosferycznego. Wspomina o tym już Prażmowski (1889) a ostatnio Plotho (1941).

Z przeprowadzonych doświadczeń przy użyciu skrobi różnego pochodzenia okazało się, że nie każda skrobia umożliwia wiązanie azotu atmo-

sferycznego. Zależy to prawdopodobnie od jej technicznego przygotowania. Glikoza okazała się nieodpowiednia dla procesu wiązania azotu atmosferycznego w warunkach doświadczenia. Można by z tego wnioskować, że chyba własności fizyczne skrobi mogą stanowić o jej przydatności do wiązania azotu atmosferycznego.

LITERATURA

Fred E. B., Baldwin I. L., Mc Coy E., 1932: Root nodule bacteria and leguminous plants. Madison.

Plotho O., 1940: Beiträge zur Kenntnis der Morphologie und Physiologie der Aktinomyceten. *Archiv Mikrobiol.*, **11**: 1.

Plotho O., 1941: Die Synthese der Knöllchen an den Wurzeln der Erle. *Archiv Mikrobiol.*, **12**: 1.

Prażmowski A., 1889: Das Wesen und die biologische Bedeutung der Wurzelknöllchen der Erbse. *Botan. Zentr.*, **39**.

Virtanen A. I., Saastamoinen S., 1936: Untersuchungen über die Stickstoffbindung bei der Erle. *Biochem Ztschr.*, **284**: 72.

M. Fiuczek

ATMOSPHERIC NITROGEN FIXATION IN PURE CULTURE OF *STREPTOMYCES ALNI*

Summary

Experiments on the atmospheric nitrogen fixation in pure cultures of *Streptomyces alni* were conducted. It is shown that:

1. On the medium of a given composition of inorganic substances with the starch (Gliwice) as a source of carbon, *Streptomyces alni* can fix atmospheric nitrogen in amounts of ca 4,8 mg in 200 ml medium at 23°.

2. When glucose was used as the source of carbon, the fixation of atmospheric nitrogen did not occur.

3. The formation of conidia needs besides mineral substances also organic ones.

DYSKUSJA

A. Mieczyńska

Minimalne przyrosty azotu, jakie otrzymano w hodowli *Streptomyces alni*, mogły leżeć w granicach błędu doświadczalnego. Czy analizy były prowadzone przy pomocy metody mikro- czy makro-Kjeldahla?

J. Ziemięcka

Czy oznaczano wydajność procesu związanego azotu w stosunku do zużytej skrobi?

Odpowiedź autora.

Ilość związanego azotu określano przy pomocy metody makro-Kjeldahla. Ilości zasymilowanego azotu, chociaż nie duże, są jednak rzeczywiste. Gdyby był to błąd w oznaczeniu, nie byłoby różnic w ilości azotu zasymilowanego z atmosfery na pożywce ze skrobią i z glikozą.

Wydajności procesu wiązania azotu w stosunku do skrobi nie oznaczano.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1959, 8 : 289—294

J. Niewiarowska

SYMBIOZA U ROKITNIKA

Z Katedry Fizjologii Roślin Uniwersytetu Warszawskiego

WSTĘP

Zagadnienie symbiozy u *Hippophae, Elaeagnus, Alnus* i *Myrica* było od dawna tematem badań i dyskusji. Różni badacze na podstawie swoich wyników dochodzili do różnych wniosków. Niektórzy twierdzili, że mikroorganizmami symbiotycznymi są bakterie właściwe, inni że promieniowce lub grzyby. Bottomley (1912, 1915) i Spratt (1912) doszli do wniosku, że są one identyczne z *Rhizobium.*

Najlepiej poznana została symbioza u olchy. Plotho (1941) wyizolowała mikroorganizmy symbiotyczne i określiła je jako *Streptomyces alni.* Uzyskała ona również zakażenie roślin tymi szczepami. Następnie Taubert (1956) określił sposób zakażania korzeni przez materiał z roztartych rizotamni (izolacja promieniowców z brodawek nie udała mu się) i zaobserwował przenikanie nici przez włośnik.

Mikroorganizmy symbiotyczne z *Hippophae* nie zostały dotychczas wyizolowane, a zakażenie roślin doświadczalnych uzyskano jedynie z pomocą materiału z roztartych brodawek (Roberg 1934), przy czym stwierdzono, że materiał z roztartych brodawek rokitnika nie zakaża olchy i odwrotnie.

Hawker i Fraymouth (1956) na podstawie swoich badań cytologicznych stwierdziły, że organizm symbiotyczny (określony przez nie mylnie jako plasmodium) przechodzi w roślinie pewien cykl. Skrawki robione ze szczytu brodawki wykazują stadium bezpostaciowej masy protoplazmy, otaczającej jądro komórki. Masa ta przenika do sąsiednich komórek.

W następnej strefie komórki gospodarza wypełnione są gronkami małych, okrągłych pęcherzyków (o średnicy 4 μ), w których można wyróżnić ziarnistości, utożsamiane przez autorki, z jądrem w stanie podziału. Dalej występują pęcherzyki wypełnione gęstą protoplazmą i otoczone jasną

błoną. Z pęcherzyków tych uwalniają się małe ciała wielkości około 0,5 μ, które pływają w śluzowatej masie i mogą przedostawać się do sąsiednich komórek. Autorki zauważyły, że w przypadku pomieszania się treści dwóch sąsiednich komórek ziarnistości te są prawie dwukrotnie większe, co wskazywałoby na ich koniugację. W tej formie przypuszczalnie przedostają się one do gleby.

BADANIA WŁASNE

Wyodrębnianie mikroorganizmów symbiotycznych

Do celu tego używałam świeżych brodawek z rokitników rosnących na skarpie nadwiślańskiej na Bielanach. Doświadczalnie stwierdziłam, że najskuteczniejsze jest ich wyjaławianie 1-procentową wodą bromową przez okres 10 minut (stosowanie słabszego stężenia lub krótszego czasu nie daje całkowitego wyjałowienia). W przypadku bardzo zbitych rizotamniów, kiedy nie można usunąć cząsteczek gleby, nawet i takie wyjałowienie nie jest wystarczające do otrzymania czystej kultury promieniowców.

Wyjałowione brodawki rozcierałam w jałowym moździerzu i szczepiłam nimi następujące pożywki:

1. K_2HPO_4 — 0,05%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,01%, NaCl — 0,01%, cytrynian żelaza — 0,0005%, $CaCO_3$ — 0,05%, glikoza — 1,0%, agar — 1,5%.

2. K_2HPO_4 — 0,08%, KH_2PO_4 — 0,11%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,02%, NaCl — 0,005%, cytrynian żelaza — 0,0005%, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ — 0,02%, skrobia — 1,0%, agar 1,5%.

Na czwarty dzień na szalkach otrzymywałam wzrost kolonii symbiotycznych promieniowców. Wyizolowałam 20 szczepów. Wśród nich można było wyróżnić szczepy białe — nie wytwarzające barwnika i szczepy wytwarzające ciemny, brązowy barwnik. W niektórych przypadkach otrzymałam na jednej szalce obok przeważającej ilości kolonii jednego typu kilka kolonii drugiego typu.

Z niektórych brodawek użytych w doświadczeniach nie udało mi się w ogóle uzyskać wzrostu mikroorganizmów.

Doświadczenia wazonowe

Do wazonów o pojemności 10 kg piasku dodano pożywkę o składzie: (ilość na 1 wazon):

K_2HPO_4 — 0,50 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,60 g
$CaCl_2 \cdot 6H_2O$ — 0,20 g
cytrynian żelaza — 0,02 g
roztwór A-Z zmodyfikowany — 2 ml.

Pojemność wodna piasku wynosiła 20%. Początkowo utrzymywałam wilgotność 60% pojemności wodnej. Później zmniejszyłam stopniowo tę ilość do 40%. Nasiona sterylizowane 5 minut w 1-procentowej wodzie bromowej i następnie płukane przez

2 doby w wodzie bieżącej wodociągowej, kiełkowały w jałowych szalkach Petriego na krążkach bibuły filtracyjnej w 24°. Po 3 dniach kiełki były dostatecznie duże i nasiona wysadzano do wazonów.

Nastawiłam następujące kombinacje:

3 wazony — pożywka bez N, nieszczepione

3 wazony — pożywka + 0,75 NH_4NO_3, nieszczepione

20 wazonów — pożywka bez N, szczepione wyizolowanymi szczepami.

W pierwszym roku nie nastąpiło zakażenie. Różnica we wzroście roślin na pożywce z azotem i pozostałych (bez azotu szczepionych i nie szczepionych) była dość znaczna. Dopiero w drugim roku, w połowie sierpnia, zaczęła się wyraźnie zaznaczać różnica we wzroście między roślinami szczepionymi a nie szczepionymi. Rośliny szczepione zaczęły się gwałtownie poprawiać i przerosły nawet rośliny hodowane na pożywce z azotem.

W połowie października sprawdziłam stan zakażenia. Wyniki były następujące:

1) w 3 wazonach z N żadna roślina nie uległa infekcji, 2) w 3 wazonach bez N nie szczepionych mniej więcej 1 roślina na wazon uległa zakażeniu i miała po 1 brodawce, 3) w wazonach zakażonych większość roślin była zakażona i posiadała liczne brodawki.

Powyższe doświadczenie nie dało wprawdzie pełnej odpowiedzi co do zdolności wyodrębnionych szczepów do zakażenia rośliny, ponieważ w wazonach kontrolnych nastąpiło sporadyczne zakażenie, jednak można z niego wyciągnąć pewne wnioski:

1. Mikroorganizmy symbiotyczne wiążą azot w symbiozie z rokitnikiem, co pozwala roślinie na normalny rozwój na podłożu bezazotowym.

2. W pierwszym roku zakażenie jest jedynie sporadyczne.

3. Zakażeniu ulegają rośliny dobrze rozwinięte (rośliny od początku źle rozwijające się nie uległy infekcji).

4. Większe ilości azotu w podłożu hamują infekcję (rośliny na pożywce z azotem nie uległy zakażeniu, podczas gdy rośliny kontrolne, nie szczepione, na pożywce bezazotowej ulegały sporadycznemu zakażeniu).

Doświadczenie to zostało powtórzone w 1958 r., przy czym piasek w wazonach został wyjałowiony w autoklawie a do wazonów dodano różne ilości azotu, celem stwierdzenia wpływu ilości azotu w podłożu na infekcję. Wyniki będą opracowane dopiero w przyszłym roku.

W kulturach wodnych nie udało mi się uzyskać infekcji.

Hodowle kropelkowe

Celem zbadania rozwoju promieniowców z form pęcherzykowatych, występujących w brodawkach, prowadziłam mikrohodowle w kropli wiszącej na pożywce o składzie podanym powyżej (pożywka 2 do izolowania promieniowców) z tym, że do pożywki dodawano jedynie 0,1% agaru.

Pożywkę tę szczepiłam materiałem z roztartych brodawek. Z wielu prowadzonych obserwacji wyciągnęłam wniosek, że formy pęcherzykowate nie są zdolne do rozwoju na sztucznym podłożu (czym należy tłumaczyć niepowodzenie w uzyskaniu kultur promieniowców przez Plotho z pęcherzyków izolowanych mikromanipulatorem z brodawek olch). Promieniowce rozwijają się z form gonidialnych, powstałych z pęcherzyków wewnątrz rośliny w toku ich przemian. (Występowanie tych form zostało stwierdzone przez Hawker i Fraymouth 1956), przy czym należy zaznaczyć, że tylko nieliczne z tych form są zdolne do rozwoju.

Potwierdza to obserwacja, że z bardzo młodych brodawek, w których prawdopodobnie formy te jeszcze nie występują, nie udało mi się uzyskać wzrostu promieniowców na podłożu agarowym.

Charakterystyka wyodrębnionych szczepów

Na pożywce podanej powyżej ze skrobią można wyróżnić 2 rodzaje szczepów: nie dające barwnika — białe i wytwarzające barwnik brązowy. Jedne i drugie na pożywce tej dają strzępki powietrzne dużo grubsze, wypełniające się ziarnistościami gramdodatnimi, które uwalniają się i po kilku dniach tworzą pałeczki. W starszych kulturach strzępki dają na końcach lub w przebiegu nici nabrzmienie wielkości około 3 μ. Nabrzmienia te wypełniają się ziarnistościami. W starych kulturach, oderwane od nici przypominają formy pęcherzykowate, występujące w brodawce. W hodowli kropelkowej prowadzonej z pałeczek wytworzonych na tej pożywce zaobserwowałam kiełkowanie pałeczek na strzępki (nie promieniste, tylko z jednego bieguna), które następnie grubieją i wypełnione są ziarnistościami gramdodatnimi. Już po 4 dniach można zaobserwować tworzące się rozdęcia, raczej w przebiegu nici — wypełnione ziarnistościami. Na pożywce z glikozą grzybnia powietrzna nie tworzy się wcale lub bardzo słabo.

Na pożywce z glikozą i peptonem strzępki już na trzeci dzień rozpadają się na ziarnistą masę a kolonia staje się miękka. U niektórych szczepów nie wytwarzają się formy pałeczkowate na tej pożywce i kolonia pozostaje gładka, natomiast u innych pałeczki są wytwarzane i kolonia pokrywa się puszystym, białym nalotem.

Na ziemniaku promieniowce rozpadają się na krótkie odcinki, przypominające mykobakterie. W starszej hodowli następuje również rozpad strzępek, a u niektórych szczepów wytwarzanie pałeczek. Można też zaobserwować występowanie form rozdętych.

Mleko peptonizują i alkalizują.

Żelatynę hydrolizują.

Na wodzie peptonowej 2-procentowej nie rosną a na 1-procentowej wzrost jest bardzo słaby.

Azotany redukują.

Optimum temperatury leży poniżej 28°, w temperaturze 34° na pożywce płynnej nie rosną.

Optimum *pH* leży około 7.

Wiązanie azotu

U 6 szczepów sprawdzono zdolność wiązania wolnego azotu w płynnej kulturze. Na pożywce płynnej ze skrobią produkcji gliwickiej (skład podany na str. 290) wszystkie szczepy wiązały azot w ilości 1,8-1,9 mg na 100 ml pożywki. Na tej samej pożywce z dodatkiem dekstryny lub glikozy oraz na pożywce stosowanej przez Plotho z dodatkiem gliceryny jako źródła węgla azotu nie wiążą.

Obecnie badam wpływ wyciągu z korzeni rokitnika na wiązanie azotu przez szczepy symbiotycznych promieniowców w płynnych kulturach.

LITERATURA

Bottomley W. B., 1912: The root-nodules of *Myrica gale*. *Ann. Botan.* **26**: 111.

Bottomley W. B., 1915: The root-nodules of *Ceanothus americanus*. *Ann. Botan.*, **29**: 506.

Hawker L. E., Fraymouth J., 1951: A re-investigation of the root-nodules of species of *Elaeagnus*, *Hippophae*, *Alnus* and *Myrica*, with special reference to the morphology and life histories of the causative organisms. *J. gen. Microbiol.*, **5**: 369.

Plotho O. V., 1941: Die Synthese der Knöllchen an den Wurzeln der Erle. *Arch. Mikrobiol.*, **12**: 1.

Roberg M., 1934: Über den Erreger der Wurzelknöllchen von *Alnus* und den *Elaeagnaceen Eleagnus* und *Hippophae*. *Jahrb. Wiss. Botan.*, **79**: 472.

Spratt E. R., 1912: The morphology of the root tubercles of *Alnus* and *Elaeagnus* and the polymorphism of the organism causing their formation. *Ann. Botan.*, **26**: 119.

Taubert H., 1956: Über den Infektionsvorgang und die Entwicklung der Knöllchen bei *Alnus glutinosa* Gaertn. *Planta*, **48**: 135.

J. Niewiarowska

SYMBIOSIS IN *HIPPOPHAE RHAMNOIDES*

Summary

From the root nodules of *Hippophae rhamnoides* sterilized by 1% brom solution 20 strains of symbiotic *Actinomycetes* were isolated which were used for infecting plants grown in sand cultures. These plants underwent the infection in the second year of their growth.

Microcultures of the material taken from nodules were observed. It was stated that the *Actinomycetes* are developing not from the vesicules, but from the Gram-positive granules.

Characteristic of strains was performed on different media. It was also found, that the temperature optimum is below 28°, the *pH* optimum being about 7.

Six strains were examined on their ability for atmospheric nitrogen-fixation. Nitrogen-fixation in amounts of about 2 mg per 100 ml nonnitrogenous starch medium was found. On dextrin and glucose media nitrogen-fixation did not occur.

DYSKUSJA

J. Ziemięcka

Czy autorka sądzi, że pracowała z mieszanką szczepów czy też z jednym szczepem, który ulegał modyfikacjom?

A. Mieczyńska

Rośliny rosnące w kulturach wodnych można wówczas zakazić, jeżeli część korzenia znajduje się nad powierzchnią płynu pożywki. Potwierdziły to doświadczenia prowadzone w pracowni Fizjologii Roślin w Puławach z łubinem w kulturach wodnych.

Odpowiedź autorki:

Przy pasażowaniu promieniowców przez rośliny otrzymywano szczepy podobne lub hodowlę mieszaną z dwu szczepów, różniących się jedynie wytwarzaniem barwnika.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1959, 8 : 295—298

A. Drozdowicz

W SPRAWIE OPORNOŚCI ROŚLIN NA ZAKAŻENIE NIESWOISTYM SZCZEPEM *RHIZOBIUM*

Doniesienie

Z Zakładu Mikrobiologii Rolnej Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

W hodowlach probówkowych sprawdzono brak wirulencji badanego szczepu *Rhizobium trifolii* w stosunku do *Pisum sativum*. Doświadczenie prowadzono na materiale siewnym, wyjałowionym w wysokich probówkach o średnicy 2-3 cm, zawierających agaryzowaną pożywkę. Bakterie wprowadzano w postaci zawiesiny uzyskanej przez zmycie ze skosu agarowego (pożywka syntetyczna z glikozą i azotanem potasu) kilkudniowych hodowli *Rhizobium*. Bakterie zmywano fizjologicznym roztworem NaCl.

Zakażenie prowadzono: a) zaprawiając nasiona bezpośrednio przed wysiewem przez zanurzenie w zawiesinie bakterii, b) nanosząc pipetką zawiesinę na nasienie umieszczone na słupku agarowym, c) wprowadzając zawiesinę pipetką już po wykorzenieniu w bezpośrednie sąsiedztwo korzonka. W każdym wariancie szczepiono 5-7 probówek równoległych. Obserwacje prowadzono do pojawienia się pierwszych listków. Rozwój roślinek był bardzo słaby zarówno w probówkach szczepionych jak i kontrolnych. W kilku probówkach rośliny nie wzeszły. W żadnej z probówek nie stwierdzono tworzenia się brodawek, w żadnej też nie stwierdzono ujemnego wpływu szczepienia. Rozwój bakterii na agarze był bardzo słaby.

Doświadczenie powtórzono szczepiąc nasiona bakteriami hodowanymi uprzednio na pożywce zawierającej wyciąg z grochu, z dodatkiem i bez dodatku fosforanów i glikozy. Wzrost bakterii na tych podłożach był dobry, powstawały dość duże ilości śluzu. Nie stwierdzono jednak istotniejszych różnic ani w obrazie hodowli, ani w wyglądzie komórek w porównaniu ze wzrostem na pożywce syntetycznej. Kilkakrotnie pasażowanym szczepem zakażano materiał siewny przez zaprawianie nasion. Na żadnej z roślin nie stwierdzono formowania się brodawek.

Przeprowadzono badanie nad wpływem na *Rhizobium trifolii* przesączu otrzymanego przez przepuszczenie przez porcelanowy filtr bakteriologiczny soków tkankowych *Pisum sativum*. Roślinki hodowane na glebie w drewnianych skrzynkach, niektóre brodawkujące, niektóre bez brodawek — przemywano wodą i następnie rozcierano w moździerzu łącznie części nadziemne i korzonki. Z miazgi wyciskano przez gazę sok, który następnie sączono przez bibułę i watę (przy dodatku niewielkich ilości wody) a potem przez filtr. Przesącz badano na jałowość przez wysiew na płytki z agarem bulionowym. 2-3 ezy przesączu wnoszono jałowo do probówki z rozpuszczoną i oziębioną do około 45° agarową pożywką syntetyczną, po czym pożywkę zakażano badanym szczepem. Z probówki I przenoszono I ezę zakażonej i zawierającej przesącz pożywki do probówki II, a z tej odpowiednio do III. Następnie zawartość probówek wylano na płytki. Po inkubacji (28-30°) stwierdzono, że na wszystkich płytkach zawierających pożywkę z dodatkiem przesączu wzrost bakterii był znacznie słabszy niż w kontroli (wysiew na pożywkę bez dodatku przesączu); wyrosło na nich, odpowiednio do stopnia rozcieńczenia materiału zakażającego, mniej kolonii. Rozmiary kolonii również były mniejsze.

Doświadczenie powtórzono, dodając tym razem do I probówki 0,5 ml przesączu i zakażając podłoże taką samą jak w poprzednim doświadczeniu ilością bakterii. Otrzymany obraz niemal nie różnił się od obrazów wzrostu stwierdzonych w poprzednim doświadczeniu; dodatek przesączu działał wyraźnie ograniczająco. Nie stwierdzono natomiast wpływu zwiększenia dawki przesączu.

Wpływ przesączu badano również nanosząc go na płytkę z agarową pożywką syntetyczną, posianą powierzchniowo zawiesiną badanego szczepu. W doświadczeniu tym przesącz nanoszono punktowo ezą bezpośrednio po posiewie. Badano przesącz macierzysty i w rozcieńczeniach 1 : 10, 1 : 100, 1 : 1000 i 1 : 10 000, przygotowanych na fizjologicznym roztworze NaCl. Efekt dodatni wyrażający się w pojawieniu stwierdzalnych przejaśnień, otrzymano wokół 30% punktów, na które naniesiono przesącz. Różnice między działaniem różnych stężeń przesączu były minimalne. Wyniki odczytano po 48 godzinach hodowli w 28-30°. Przy późniejszych obserwacjach nie stwierdzono zmiany obrazu. Wyniki doświadczenia nie dawały jednak podstaw do właściwej interpretacji, gdyż nie udało się uzyskać równomiernego wzrostu bakterii na powierzchni płytki.

W następnym doświadczeniu działano przesączem na 24- i 48-godzinne hodowle *Rhizobium* na agarowej pożywce syntetycznej. Naniesienie ezą przesączu bezpośrednio na kolonie na płytce, jak i dość obfite zwilżenie przesączem wzrostu na skosie agarowym nie wywołało stwierdzalnych zmian w wyglądzie hodowli w porównaniu z kontrolą (kolonie i wzrost na skosie zwilżone fizjologicznym roztworem NaCl).

Badano wpływ wspólnej inkubacji przesączu z badanymi bakteriami na aktywność czynnika hamującego. Do hodowli *Rh. trifolii* na skosie agarowym dodawano około 3 ml przesączu soku roślinnego i łącznie inkubowano w 28-30° przez 24 godziny, często przechylając probówkę dla zetknięcia przesączu z bakteriami. Po 24 godzinach płyn dekantowano i sączono przez filtr bakteriologiczny. Przesącz stosowano w identyczny sposób jak w doświadczeniu pierwszym. Rozwój drobnoustrojów na podłożu z dodatkiem minimalnych ilości przesączu (2-3 ezy do probówki wyjściowej) był zdecydowanie słabszy niż na płytkach kontrolnych. Nie stwierdzono natomiast żadnych różnic (przy stosowanych dawkach) między działaniem przesączu macierzystego a przesączu inkubowanego wraz z bakteriami. Zbadany, w charakterze kontroli, dodatek przesączu zawiesiny bakterii w roztworze fizjologicznym NaCl nie wywierał wpływu na rozwój bakterii.

A. Drozdowicz

ON THE RESISTANCE OF LEGUMINOUS PLANTS AGAINST THEIR INFECTION WITH A NONSPECIFIC STRAIN OF *RHIZOBIUM*

Summary

The author has found, that the plants of *Pisum sativum* contain a filterable factor, which inhibits the development of *Rhizobium trifolii*, when added even in very small amounts to their cultures.

The nature of this factor has not been identified till present. Inhibiting effect was observed only when factor was added to cultures of *Rh. trifolii* at the start of their growth. Factor added after 24-48 hours of incubation of bacteria had no influence on bacterial growth.

The factor was not inactivated during incubation with bacterial cells.

DYSKUSJA

J. Ziemięcka

Należałoby przy pomocy nowych metod (np. chromatografii) zbadać skład chemiczny wydzielin poszczególnych grup roślin. Wydzieliny te mogą mieć różny wpływ na różne grupy bakterii. Stwierdzono np., że sok *Galega* wpływa ujemnie na *Rhizobium* lucerny.

M. Kowalski

Czy w badaniach autora wykluczono możliwość litycznego działania bakteriofaga na populację *Rhizobium trifolii*? Bakteriofag mógł być obecny w przesączach z grochu i działać litycznie na bakterie koniczyny.

J. Gołębiowska

Istnieje zbieżność wyników uzyskanych przez autora i Bonniera, który w ostatnich swoich pracach zwraca uwagę na ujemny wpływ wydzielin korzeniowych z jednej grupy roślin na bakterie z innej grupy.

Odpowiedź autora:

Nie jest wykluczone, że opisany czynnik, hamujący wzrost *Rh. trifolii* posiadał charakter faga. Zagadnienie to należałoby jeszcze dokładnie zbadać.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1959, 8 : 299—300

J. Gołębiowska i *U. Sypniewska*

WPŁYW ROŚLINY NA ROZWÓJ JEJ WSPÓŁŻYCIA Z *RHIZOBIUM*

I. ROZWÓJ TKANKI BAKTEROIDALNEJ W NAROŚLACH KORZENIOWYCH RÓŻNYCH ODMIAN ŁUBINU

Doniesienie

Z Pracowni Mikrobiologicznej Zakładu Roślin Pastewnych Instytutu Uprawy, Nawożenia i Gleboznawstwa w Poznaniu

W poprzedniej pracy (J. Gołębiowska — Tworzenie bakteroidów i form inwolucyjnych przez *Rh. meliloti* i *Rh. trifolii* — komunikat na Sesji Naukowej poświęconej roślinom pastewnym, Poznań, czerwiec 1958 rok), podano wyniki badań nad zdolnością tworzenia bakteroidów przez *Rh. trifolii* i *Rh. meliloti* w symbiozie z roślinami i w hodowlach na pożywkach płynnych. Stwierdzono, że formy bakteroidalne w naroślach na koniczynie i lucernie mają określony kształt i wielkość. Przechodzą one jednak w tkance bakteroidalnej przez cykl rozwojowy, charakteryzujący się określonymi zmianami w wewnętrznej budowie komórki. Formy powstające pod wpływem bodźców chemicznych nie mają naszym zdaniem właściwości bakteroidów i są raczej formami zdegenerowanymi.

Obecnie prowadzimy obserwacje nad rozwojem symbiozy u różnych odmian łubinu, chcąc wyjaśnić wpływ natury rośliny na rozwój i budowę bakteroidów w jej naroślach korzeniowych. Dotychczas przeprowadzono dwukrotną obserwację młodszej i starszej tkanki bakteroidalnej z narośli na łubinach w uprawie polowej, po 5 i po 7 tygodniach od dnia wysiewu. Badaniom tym poddano 16 odmian łubinu.

Zaobserwowano dość wyraźne różnice w rozmieszczeniu i budowie narośli na korzeniach różnych gatunków łubinu: na łubinie żółtym, białym i wąskolistnym. Nie zauważono pod tym względem różnic w poszczególnych odmianach tych gatunków, nie zauważono też zasadniczych różnic w budowie narośli na korzeniach łubinu gorzkiego i słodkiego.

W rozwoju samych bakteroidów w poszczególnych preparatach zaobserwowano dość znaczne różnice, nie łączące się jednakże w tym wypadku z gatunkiem rośliny, lecz z okresem rozwoju brodawki korzeniowej.

Na uwagę zasługuje budowa komórek bakteroidów u łubinu wąskolistnego, „Wielkopolskiego", gorzkiego (fot. 1 a i 1 b). We wcześniejszym stadium rozwoju brodawki plazma w bakteroidach była wyraźnie zróżnicowana. W późniejszym okresie komórki zabarwiły się fuksyną bardzo silnie i jednolicie, zatracając przy tym regularność kształtów. Bakteroidy łubinu wąskolistnego, odmiana „Szarak" (fot. 2 a i 2 b) wykształcały się jako wyraźnie zarysowane rozwidlone nici z granulacją we wnętrzu komórek. W miarę rozwoju komórki częściowo ulegały lizie i w obrazie mikroskopowym pojawiały się bardzo charakterystyczne, nie barwiące się fuksyną kuliste ciała. U łubinu białego, średniowczesnego zwraca uwagę duże powinowactwo plazmy w komórkach bakteroidów do barwnika, co powoduje silne zabarwianie się nici bakteroidalnych (fot. 3 a). Tkanka bakteroidalna w starszych narośla tego łubinu ulegała zupełnemu przekształceniu. W obrazie mikroskopowym (fot. 3 b) trudno było wyśledzić zarysy komórek i pojawiały się bardzo licznie niebarwiące się kuliste ciała, obok silnie zabarwionej pozostałości plazmy komórkowej. Praca ta jest w toku i przedstawione obserwacje wymagają jeszcze potwierdzenia.

J. Gołębiowska and *U. Sypniewska*

THE INFLUENCE OF THE HOST PLANT ON THE DEVELOPMENT OF ITS SYMBIOSIS WITH *RHIZOBIUM*

I THE INFLUENCE OF DIFFERENT SPECIES AND VARIETIES OF LUPINE ON THE DEVELOPMENT OF BACTEROIDS IN THEIR NODULES.

Summary

The observations were carried out on the development of the symbiosis of the different species and varieties of *Lupinus*.

Totally 16 varieties of *Lupinus* were investigated.

There were discovered the plain differences in the dislocation and the structure of the nodules on the roots of different species of *Lupinus*.

The structures of the bacteroides themselves were different according to the stage of growing of the nodules.

The photograps 1-3 show these differences.

Bakteroidy z brodawek korzeniowych na łubinie
The bacteroids from the nodules on the roots of lupinus

1. Wąskolistny „Wielkopolski", gorzki

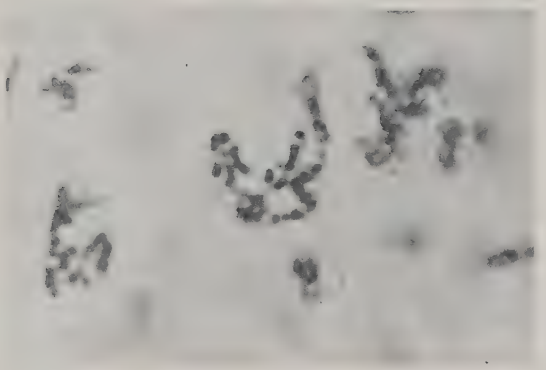
a — z młodszej brodawki from younger nodule b — ze starszej brodawki from older nodule

2. Wąskolistny „Szarak", słodki

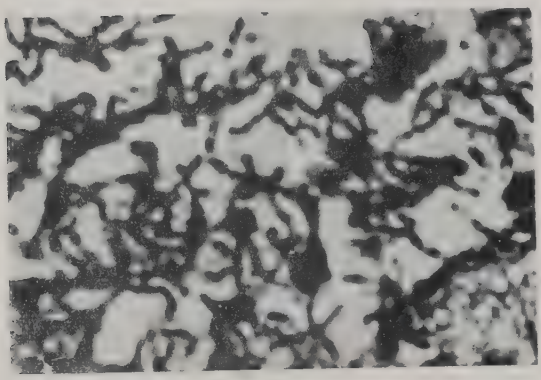
a — z młodszej brodawki from younger nodule b — ze starszej brodawki from older nodule

3. Biały „Średniowczesny", słodki

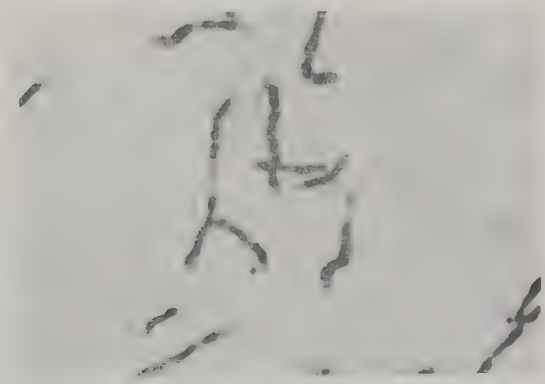
a — z młodszej brodawki from younger nodule b — ze starszej brodawki from older nodule



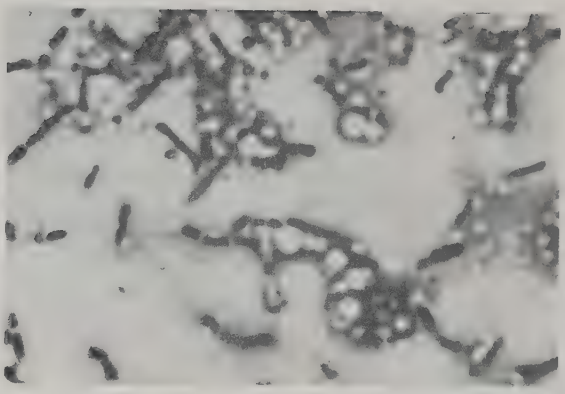
1a



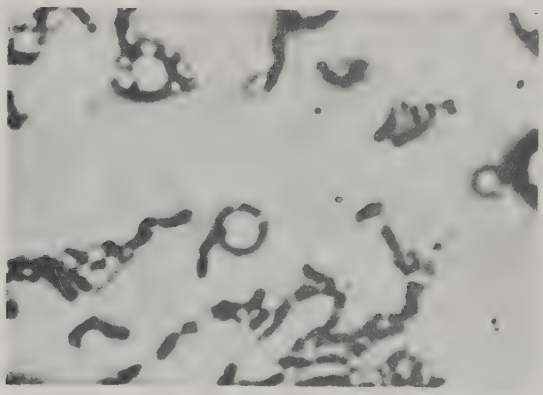
1b



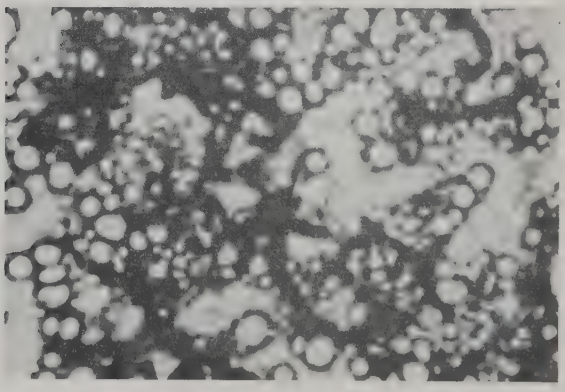
2a



2b



3a



3b

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1959, 8 : 301—302

U. Sypniewska

WPŁYW ROŚLINY NA ROZWÓJ JEJ SYMBIOZY Z *RHIZOBIUM*

II. ROZWÓJ NAROŚLI KORZENIOWYCH U RÓŻNYCH ODMIAN I RODÓW SERADELI

Doniesienie

Z Pracowni Mikrobiologicznej Zakładu Roślin Pastewnych Instytutu Uprawy, Nawożenia i Gleboznawstwa w Poznaniu

Zakład Roślin Pastewnych IUNG ma w swej kolekcji szereg ciekawych rodów i odmian seradeli, różniących się wielkością plonu, szybkością wegetacji, pokrojem roślin itp. W naszych badaniach pragniemy zająć się rozwojem symbiozy u poszczególnych rodów i odmian tej rośliny. Pomoże to nam z jednej strony do wytypowania najcenniejszych rodów tj. wiążących duże ilości azotu, z drugiej strony może przyczynić się do wyświetlenia roli rośliny przy jej współżyciu z *Rhizobium*.

W 1958 r. obserwacje wstępne rozpoczęto z dwoma rodami i trzema odmianami seradeli w doświadczeniu polowym. Do badań brano rośliny z poletek nie nawożonych lub nawożonych azotem (saletrą wapniową w ilości 15 kg N/ha).

Początek brodawkowania wszystkich obserwowanych odmian seradeli, zarówno nawożonych jak i nie nawożonych azotem, zanotowano w 20 dni po wschodach, pełnię brodawkowania w 25 dni po wschodach, w okresie zawiązywania pączków kwiatowych. Przy późniejszych obserwacjach zauważono szybkie starzenie się narośli korzeniowych u seradeli nawożonej azotem. Brodawki starsze stawały się brązowe i w preparatach mikroskopowych stwierdzono w nich zanik tkanki bakteroidalnej. Nowo powstające narośla na młodszych, bocznych korzeniach były blado-żółte i wypełnione jasnym miąższem. Brodawki z roślin nie nawożonych azotem obserwowane w tym samym czasie, były wypełnione czynną tkanką bakteroidalną o intensywnym różowym zabarwieniu. Również drobne brodawki na korzeniach bocznych miały barwę różową.

Różnic w sposobie brodawkowania poszczególnych rodów i odmian nie zaobserwowano. Tylko w preparatach mikroskopowych znaleziono, że bakteroidy z narośli korzeniowych seradeli „Wielkolistnej" (tetraploidalnej) odznaczały się specjalnie dużymi wymiarami. Obserwacja ta wymaga jeszcze potwierdzenia.

U. Sypniewska

THE INFLUENCE OF THE HOST PLANT ON THE DEVELOPMENT OF ITS SYMBIOSIS WITH *RHIZOBIUM*

II THE DEVELOPMENT OF THE NODULES ON DIFFERENT VARIETIES OF SERRADILLA

Summary

The aim of this work was to study the development of the symbiosis of different varieties of serradilla from the collection of the Department of Fodder Plants IUNG.

The observations were carried out on the five varieties of serradilla.

The nodules on the roots of the fertilized plants grew quicker than these ones of the unfertilized plants.

There was no difference in the nodulation of investigated varieties of serradilla.

All observations need further researches.

DYSKUSJA

J. *Ziemięcka*

Dobrze się stało, że zajęto się mniej dotychczas zbadaną grupą, którą są bakterie łubinu i seradeli. Pożądane byłoby rozpoczęcie dokładnych badań cytochemicznych i zastosowanie większej ilości metod barwienia bakteroidów. Należałoby również rozpocząć badania genetyczne nad szczepami tych bakterii.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1959, 8 : 303—308

J. Buśko

UZDOLNIENIA SYMBIOTYCZNE I NIEKTÓRE CECHY FIZJOLOGICZNE BAKTERII BRODAWKOWYCH, WSPÓŁŻYJĄCYCH Z KOMONICĄ I PRZELOTEM

Doniesienie

Z Zakładu Mikrobiologii Instytutu Uprawy, Nawożenia i Gleboznawstwa w Puławach i Zakładu Mikrobiologii Rolnej Wyższej Szkoły Rolniczej w Olsztynie

Od dawna za granicą, a ostatnio i u nas, coraz szerzej wprowadza się do uprawy komonicę rożkową ze względu na dużą zawartość białka w tej roślinie oraz wysoką oporność na suszę i na wymarzanie.

W związku z tym, jako cel naszej pracy postawiliśmy sobie poznanie symbiozy komonicy z *Rhizobium*. Badaniami objęto oprócz komonicy rożkowej (*Lotus corniculatus*) również komonicę błotną (*Lotus uliginosus*) i przelot pospolity (*Anthyllis vulneraria*) jako rośliny należące w podziale Freda i współpracowników* do tej samej grupy bakteryjno-roślinnej i mające także znaczenie w rolnictwie.

W tym celu przeprowadzono w latach 1956-1958 cykl doświadczeń wazonowych. Ponadto przeprowadzono badania laboratoryjne nad niektórymi cechami fizjologicznymi tej grupy bakterii.

DOŚWIADCZENIA WAZONOWE

Wziąwszy pod uwagę znaczne różnice w warunkach środowiskowych, w jakich normalnie występują wymienione trzy gatunki roślin (komonica rożkowa i przelot pospolity — stanowiska raczej suche, komonica błotna — stanowiska bardzo wilgotne) postanowiono zbadać, czy gatunki bytujące w tak różnych środowiskach mogą być zakażane tymi samymi szczepami bakterii, czy też wymagają swoistych dla siebie szczepów.

METODYKA DOŚWIADCZEŃ

Nasiona komonicy rożkowej, komonicy błotnej i przelotu pospolitego uzyskano z Katedry Uprawy Łąk i Pastwisk WSR w Olsztynie.

Spośród wyodrębnionych z różnych stanowisk 15 szczepów bakterii brodawkowych (9 szczepów z komonicy rożkowej, 2 szczepy z komonicy błotnej i 4 szczepy z przelotu pospolitego) do doświadczeń wazonowych użyto 6 szczepów, po dwa z każdej rośliny.

* Fred E. B., Baldwin I. L., Mc Coy E., 1932: Root nodule bacteria and leguminous plants. Univ. of Wisconsin, Madison.

Doświadczenia nastawiano w wazonach z 10 kg płukanego i prażonego piasku. Stosowano nawożenie fosforowo-potasowe, wzbogacone mikroelementami.

Nasiona, sterylizowane alkoholem i sublimatem, szczepiono przed wysiewem zawiesiną komórek odpowiedniego szczepu, sporządzoną z hodowli na agarze skośnym Thorntona.

Każdy z trzech badanych gatunków roślin szczepiono następującymi szczepami *Rhizobium*: nr 4 i nr 19 pochodzącymi z komonicy rożkowej, nr 8 i nr 21 pochodzącymi z komonicy błotnej i nr 14 i nr 15 z przelotu pospolitego. Obok serii szczepionych nastawiano dla każdej z trzech roślin serię kontrolną, nieszczepioną. Wszystkie serie nastawiano w 4 powtórzeniach.

Z początkiem kwitnienia komonic wszystkie rośliny wyjmowano z wazonów. Przeprowadzano obserwacje nad brodawkowaniem oraz oznaczano masę plonu i zawartość w nim ogólnego azotu.

WYNIKI BADAŃ

Wyniki doświadczenia z roku 1957 przedstawione są w tabeli I.

Komonica rożkowa pod wpływem szczepienia szczepami nr 4 i 19 (wyodrębnionymi z brodawek komonicy rożkowej) dała w porównaniu z kontrolą znaczne przyrosty plonu, średnio na wazon 3,45 g i 4,25 g (odpowiednio do szczepu), oraz zawartości azotu, średnio 98,49 i 122,71 mg azotu na 1 wazon. Podobnie wielkie zwyżki plonu i azotu dało szczepienie komonicy rożkowej szczepami nr 14 i 15, pochodzącymi z przelotu pospolitego. Przyrosty plonu i azotu, jakie dało szczepienie komonicy rożkowej szczepami nr 8 i 21, pochodzącymi z komonicy błotnej, mieszczą się w granicach błędu doświadczalnego.

Przelot pospolity dodatnio reagował na te same szczepy, co komonica rożkowa. Szczepy nr 8 i 21 były dlań nieaktywne, choć wywoływały powstawanie brodawek.

Komonica błotna natomiast tylko w seriach szczepionych szczepami macierzystymi (nr 8 i 21, pochodzącymi z brodawek komonicy błotnej) dała znaczne zwyżki plonu i azotu. Szczepy nr 4 i 19 z komonicy rożkowej i szczepy nr 14 i 15 z przelotu pospolitego okazały się zupełnie nieaktywne dla komonicy błotnej.

Szczepy silnie wiążące azot wytwarzały na odpowiednich roślinach brodawki mniej liczne, duże i rozmieszczone bliżej szyjki korzeniowej. Szczepy nie wiążące azotu tworzyły brodawki mniejsze, gęsto rozsiane po całym systemie korzeniowym.

OMÓWIENIE WYNIKÓW I WNIOSKI

W wyniku przedstawionych badań stwierdzono, że:

1. Żaden z sześciu badanych szczepów nie był zdolny do asymilowania azotu w symbiozie ze wszystkimi trzema badanymi roślinami.

2. Szczepy wyodrębnione z brodawek komonicy błotnej współżyły tylko z komonicą błotną, będąc nieaktywne dla pozostałych roślin.

3. Każdy ze szczepów, wyodrębnionych, czy to z komonicy rożkowej, czy z przelotu pospolitego, współżył tylko z tymi dwoma roślinami; żaden z nich natomiast nie był aktywny dla komonicy błotnej.

Z uwagi na niewielką ilość szczepów przebadanych w tej pracy pod względem uzdolnień symbiotycznych nie można wykluczyć prawdopodobieństwa istnienia szczepów aktywnych dla wszystkich roślin objętych grupą bakteryjno-roślinną komonicy.

Badania te dowodzą jednak, że, podobnie jak to stwierdzono w innych grupach bakteryjno-roślinnych, i w tej grupie istnieją szczepy bakterii aktywne tylko dla niektórych roślin objętych grupą, a więc o specyficzności dalej posuniętej, niżby to wynikało z pojęcia grup bakteryjno-roślinnych.

BADANIA LABORATORYJNE

Oprócz wymienionych doświadczeń wazonowych prowadzono badania laboratoryjne nad niektórymi właściwościami fizjologicznymi bakterii komonic i przelotu.

Tabela I

Wpływ szczepienia na wysokość plonu i zawartość azotu w komonicach i przelocie (średnio na 1 wazon)

Doświadczenie wazonowe na piasku w 1957 r.

The influence of inoculation with different *Rhizobium* strains on the yield and N content in plants (mean per 1 pot)

Pot experiment in 1957

Szczep *Rhizobium* *Rhizobium* strain		Roślina Plant					
		Lotus corniculatus		*Lotus uliginosus*		*Anthyllis vulneraria*	
pochodzenie isolated from	Nr	plon yield g	azot N content mg	plon yield g	azot N content mg	plon yield g	azot N content mg
Kontrola Control		0,31	5,47	0,17	3,20	0,54	5,46
Lotus corniculatus	4	3,45	98,49	0,16	2,73	5,41	180,84
	19	4,24	122,71	0,25	3,49	6,15	243,03
Lotus uliginosus	8	0,66	17,88	2,96	111,81	0,60	7,38
	21	0,45	11,62	2,61	98,79	0,57	5,60
Anthyllis vulneraria	14	3,33	90,91	0,18	2,36	5,40	140,13
	15	3,60	91,26	0,19	2,74	5,95	178,50
Przedział ufności (P = 0,01) Interval of confidence		0.84	30,30	1,29	48,81	0,86	47,07

Dotychczas przeprowadzono badania wrażliwości 15 szczepów tych bakterii na fiolet krystaliczny i niektóre antybiotyki. Wyniki tych badań podano w tabeli II i III.

Jak wynika z danych przytoczonych w tabeli II badana grupa bakterii niejednolicie reaguje na różne stężenia fioletu krystalicznego. Dwa szczepy z komonicy błotnej (nr 8 i 21), dwa szczepy z komonicy rożkowej (nr 4 i 19) oraz dwa szczepy z przelotu pospolitego (nr 14 i 15) są znacznie wrażliwsze na fiolet krystaliczny od pozostałych szczepów. Biorąc pod uwagę fakt, że grupa bardziej wrażliwych szczepów znajduje się w hodowli laboratoryjnej o 2-3 lat dłużej od szczepów mniej wrażliwych, nasuwa się przypuszczenie, że wrażliwość na fiolet krystaliczny może być funkcją długości okresu hodowli laboratoryjnej.

Tabela II

Wrażliwość szczepów *Rhizobium* na fiolet krystaliczny
The susceptibility of *Rhizobium* to crystal violett

Szczep *Rhizobium* strain *Rhizobium*			Koncentracja fioletu krystalicznego Concentration of crystal violett							
pochodzenie isolated from	rok izolacji year of isolation	nr	8×10^{-5}	4×10^{-5}	$3{,}5\times10^{-5}$	3×10^{-5}	$2{,}5\times10^{-5}$	2×10^{-5}	$1{,}5\times10^{-5}$	1×10^{-5}
	1957	1	+	+	+	+	+	+	±	−
	„	2	+	+	+	+	+	+	±	−
	„	3	+	+	+	+	+	+	±	−
Lotus corniculatus	1954	4	+	±	−	−	−	−	−	−
	1957	5	+	+	+	+	+	−	−	−
	„	6	+	+	+	+	+	−	−	−
	„	7	+	+	+	+	+	+	±	−
	1955	19	+	±	−	−	−	−	−	−
	1957	20	+	+	+	+	+	+	+	+
Lotus uliginosus	1954	8	+	+	+	+	+	+	−	−
	1955	21	+	−	−	−	−	−	−	−
Anthyllis vulneraria	1954	14	+	−	−	−	−	−	−	−
	„	15	+	−	−	−	−	−	−	−
	1957	16	+	+	+	+	+	−	−	−
	„	17	+	+	+	+	+	−	−	−

\+ = dobry wzrost good growth ± = ślady wzrostu weak growth − = brak wzrostu no growth

Do badań nad wrażliwością *Rhizobium* na antybiotyki użyto tych samych 15 szczepów a z antybiotyków przebadano: penicylinę, streptomycynę i tetracyklinę. Antybiotyki stosowano w stężeniach: 500, 50, 5 i 0,5 jed-

nostki (penicylina) lub mikrograma (streptomycyna i tetracyklina) na 1 ml pożywki.

Jak wynika z danych przedstawionych w tabeli III szczepy pochodzące z komonicy rożkowej różnie reagowały na penicylinę: wzrost jednych (nr 1, 2, 4, 5, 20) był hamowany już przez najmniejszą dawkę penicyliny, inne (nr 3 i 7) były hamowane dopiero przez największą dawkę a pozostałe nie reagowały nawet na dawkę największą. Podobnie niejednolicie szczepy te reagowały na streptomycynę i tetracyklinę.

Oba szczepy z komonicy błotnej (nr 8 i 21) były niewrażliwe na penicylinę i tetracyklinę, jeden z nich (nr 21) również nie reagował na streptomycynę, podczas gdy wzrost drugiego (nr 8) hamowała już najmniejsza dawka streptomycyny.

Tabela III

Wrażliwość *Rhizobium* na antybiotyki

The susceptibility of *Rhizobium* to antibiotics

Szczep *Rhizobium* *Rhizobium* strain		Penicylina j/ml					Streptomycyna μg/ml					Tetracyklina μg/ml				
pochodzenie isolated from	nr	500	50	5	0,5	–	500	50	5	0,5	–	500	50	5	0,5	–
Lotus corniculatus	1	–	–	–	–	+	–	–	–	–	+	–	+	+	+	+
	2	–	–	–	–	+	–	–	–	–	+	–	–	–	–	+
	3	–	+	+	+	+	–	+	+	+	+	–	+	+	+	+
	4	–	–	–	–	+	–	–	–	–	+	–	–	–	–	+
	5	–	–	–	–	+	–	–	+	+	+	–	+	+	+	+
	6	+	+	+	+	+	–	–	+	+	+	–	+	+	+	+
	7	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	+	+	+	+
	19	·	·	+	+	·	–	–	·	+	+	–	+	+	+	+
	20	–	–	–	–	+	–	–	–	–	+	–	+	+	+	+
Lotus uliginosus	8	+	+	+	+	+	–	–	–	–	+	+	+	+	+	+
	21	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Anthyllis vulneraria	14	–	+	+	+	+	–	–	+	+	+	–	+	+	+	+
	15	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+
	16	·	·	·	·	·	–	–	–	–	·	–	·	·	·	·
	17	+	+	+	+	+	–	–	–	–	+	–	+	+	+	+

\+ = dobry wzrost good growth — = brak wzrostu no growth

Szczepy z przelotu pospolitego były prawie lub zupełnie niewrażliwe na penicylinę i tetracyklinę; na streptomycynę reagowały różnie.

Streptomycyna działała więc hamująco na największą ilość badanych szczepów *Rhizobium*. Tetracyklina działała pod tym względem najsłabiej. Penicylina zaś zajęła miejsce pośrednie.

J. Buśko

SYMBIOTIC EFFECTIVENESS AND SOME PHYSIOLOGICAL PROPERTIES OF THE NODULE BACTERIA OF *LOTUS* AND *ANTHYLLIS*

Summary

Lotus corniculatus, Lotus uliginosus and *Anthyllis vulneraria* grown in sand pots were inoculated with six *Rhizobium* strains, isolated from examined plants, Table I shows the influence of inoculation on yield and N content of the plants.

Strains derived from nodules of *Lotus uliginosus* were active in symbiosis with *Lotus uliginosus* only.

All strains derived from *Lotus corniculatus* or from *Anthyllis vulneraria* were active in symbiosis with these both plants. They were inactive in symbiosis with *Lotus uliginosus.*

There was also investigated the susceptibility of the same six *Rhizobium* strains and of further nine (7 derived from *Lotus corniculatus* and 2 from *Anthyllis vulneraria*) to crystal violett, penicillin, streptomycin and tetracyclin.

As shown in table II the investigated *Rhizobium* strains may be divided into two distinct groups: more susceptible to crystal violett (nr 4, 19, 8, 21, 14, 15) and relatively resistant. There is to be noted, that the strains cultivated in laboratory for 2-3 years were more susceptible to crystal violett than the strains recently isolated.

The susceptibility of *Rhizobium* to antibiotics is shown in table III. The strains isolated from *Lotus corniculatus* reacted very differently to all antibiotics tested. Both strains from *Lotus uliginosus* were resistant to penicillin and tetracyclin. One of them was resistant to streptomycin; while the growth of the second was inhibited even by the lowest streptomycin concentration. The strains of *Anthyllis vulneraria* were almost completely resistant to penicillin and tetracyclin; their reaction to streptomycin was variable.

DYSKUSJA

W. Boguszewski

Przy badaniu możliwości przeszczepiania *Rhizobium* z jednych gatunków roślin na inne, bardziej istotne są może warunki ekologiczne a nie pokrewieństwa roślin. Należałoby zwrócić uwagę na ten fakt badając inne gatunki roślin należące do jednego rodzaju i rosnące w odmiennych warunkach ekologicznych, jak np. koniczyna biała i szwedzka.

Odpowiedź autora:

. W badaniach nad możliwością przeszczepiania *Rhizobium* z różnych gatunków roślin stwierdzono dużą odrębność u poszczególnych szczepów nawet w stosunku do odmian tych roślin.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1959, 8 : 309—313

A. Nowotny-Mieczyńska i *J. Zinkiewicz*

WPŁYW ŻYWIENIA ROŚLINY NA AKTYWNOŚĆ *RHIZOBIUM TRIFOLII* W SYMBIOZIE Z KONICZYNĄ

Z Zakładu Fizjologii Roślin Instytutu Uprawy, Nawożenia i Gleboznawstwa w Puławach

Doniesienie

Planując nasze badania nad możliwością wzmocnienia aktywności słabego szczepu *Rhizobium* koniczyny, kierowaliśmy się założeniem, że roślina motylkowa zakażona właściwym szczepem stanowi jak gdyby nowy organizm, w którym wszystkie czynniki wpływające dodatnio lub ujemnie na rozwój makrosymbionta będą równocześnie wpływały dodatnio lub ujemnie na rozwój mikrosymbionta i *vice versa*. Wśród *Rhizobium* znajdują się szczepy o różnej aktywności — od bardzo aktywnych do pasożytniczych. Przyczyny tych różnic nie są jeszcze całkowicie wyjaśnione, wiadomo jednak, że wydajność procesu wiązania wolnego azotu przez układ symbiotyczny jest uzależniona nie tylko od aktywności zakażającego roślinę szczepu, lecz także od takich czynników jak: odpowiednio dobrany stosunek C : N w roślinie, stosunek kationów do anionów, *pH* środowiska odżywczego rośliny, natężenie procesów fotosyntetycznych rośliny i od wielu innych czynników.

Mając do dyspozycji (z Zakładu Mikrobiologii IUNG w Puławach) dwa szczepy *Rhizobium* koniczyny: szczep aktywny *A* i szczep słabo aktywny *P*, podjęłyśmy w trzyletnim doświadczeniu wazonowym (1956-1958) próbę wzmocnienia aktywności symbiotycznej badanych szczepów przez stosowanie następujących zabiegów: 1) Stosowanie wzrastających dawek NH_4NO_3. Dawki te wynosiły 50 mg N, 170 mg N i 500 mg N (w 3 porcjach) na wazon o pojemności 10 kg piasku. Piasek uprzednio płukano i sterylizowano, 2) Stosowanie wzrastających dawek K_2O (jako $KCl + K_2SO_4$ (500 mg i 750 mg na wazon), 3) Stosowanie dolistne roztworu sacharozy o stężeniu 0,05-0,1%.

W każdej z tych trzech grup doświadczalnych znajdowały się po trzy serie:
Seria I — rośliny zakażone szczepem *A* (aktywnym).
Seria II — rośliny zakażone szczepem *P* (nieaktywnym).
Seria III — rośliny niezakażone.

Tabela I

Wpływ różnych dawek N/NH_4NO_3 na aktywność symbiozy u czerwonej koniczyny
The effect of different doses of N/NH_4NO_3 upon the symbiotic effectiveness of red clover

Serie* Series*	1956				1957				1958			
	P. s. masa części nadziemnych czerwonej koniczyny na wazon Crops of red clover hay air dried, per pot											
	Dawka N na wazon = 50 mg w formie NH_4NO_3 Nitrogen added per pot = 50 mg as NH_4NO_3											
	Plon roślin Yield of plant g	% N	Plon N Total yield of N mg	Przyswojony symbiotycznie N Symbiotically fixed N mg	Plon roślin Yield of plants g	% N	Plon N Yield of N mg	Przyswojony symbiotycznie N Symbiotically fixed N mg	Plon Yield g	% N	Plon N Yield of N mg	Przyswojony symbiotycznie N Symbiotically fixed N mg
A	6,95±0,83	4,23	293	243	7,22±0,41	3,24	237	187	11,13±0,33	3,46	383	332
P	2,12±0,24	3,45	72	22	3,75±0,35	3,30	124	74	4,49±0,30	2,74	123	72
N									3,00±0,08	1,70	50	
	Dawka N na wazon = 170 mg w formie NH_4NO_3 Nitrogen added per pot = 170 mg as NH_4NO_3											
A	9,80±0,53	3,70	359	226	9,32±0,64	3,07	286	146				
P	7,02±0,74	2,91	203	70	7,16±0,87	2,85	204	64				
N	7,08±0,46	1,80	133		7,08±0,46	1,85	140					
	Dawka N na wazon = 500 mg w formie NH_4NO_3 Nitrogen added per pot = 500 mg as NH_4NO_3											
A	11,43±0,47	3,50	396	90	10,35±0,29	3,06	317	71	15,1 ±0,45	3,32	501	160
P	9,17±0,67	3,25	298	8	8,61±0,21	3,17	273	27	14,93±0,21	2,73	407	60
N	11,13±0,26	2,75	306		7,81±0,85	3,12	246		14,09±0,44	2,43	341	

* N — nieszczepione — uninoculated. Szczepy *Rhizobium* — *Rhizobium* strains A — aktywny — active, P — nieaktywny — inactive

Tabela II

Wpływ K_2O na aktywność symbiotyczną czerwonej koniczyny
The effect of K_2O upon the symbiotic effectiveness of red clover

Serie* Series*		1957 r.				1958 r.			
		P. s. masa części nadziemnych czerwonej koniczyny na wazon Crops of clover hay air dried, per pot							
		Dawka N na wazon = 50 mg w formie NH_4NO_3 Nitrogen added per pot = 50 mg as NH_4NO_3							
		Plon roślin Yield of plant g	Względny plon % Yield in p. c.	Plon N Total yield of N mg	Względny plon N % Yield of N in p. c.	Plon roślin Yield of plant g	Względny plon % Yield in p. c.	Plon N Total yield of N mg	Względny plon N % Yield of N p. c. in
A	K_2O = 500 mg	7,32±0,41	100	237	100	11,13±0,33	100	383	100
	K_2O = 750 mg	9,92±0,21	135	325	188	13,92±0,85	125	494	130
P	K_2O = 500 mg	3,75±0,35	100	124	100	4,49±0,30	100	123	100
	K_2O = 750 mg	4,86±0,38	129	167	134	5,12±0,49	114	145	118
	Dawka N na wazon = 170 mg w formie NH_4NO_3 — Nitrogen added per pot = 170 mg as NH_4NO_3								
A	K_2O = 500 mg	9,32±0,64	100	286	100				
	K_2O = 750 mg	9,64±0,61	103	306	107				
P	K_2O = 500 mg	7,16 0,81	100	204	100				
	K_2O = 750 mg	8,05 0,29	112	226	110				
	Dawka N na wazon = 500 mg w formie NH_4NO_3 — Nitrogen added per pot = 500 mg as NH_4NO_3								
A	K_2O = 500 mg	10,35 ± 0,29	100	317	100	15,10±0,45	100	501	100
	K_2O = 750 mg	11,6± 10,74	112	359	113	14,74±0,93	97	507	102
P	K_2O = 500 mg	8,61±0,21	100	273	100	14,93±0,21	100	407	100
	K_2O = 750 mg	8,32±0,62	96	260	94	14,08±0,27	94	427	105
N	K_2O = 500 mg					14,00±0,44	100	341	100
	K_2O = 750 mg					13,61±0,37	90	343	100

* N — nieszczepione — uninoculated. Szczepy *Rhizobium* — *Rhizobium* strains: A — aktywny — active, P — nieaktywny — inactive

Do badań użyto koniczyny czerwonej zwykłej. Rośliny wszystkich trzech serii były jednakowo zasilane w optymalnej ilości wszystkimi składnikami pokarmowymi; tylko ilości azotu i potasu były zmienne wg powyższego planu badań. W okresie poprzedzającym kwitnienie koniczyny wyjmowano w każdej serii po 1 roślinie z każdego wazonu (8 wazonów w każdej serii, po 15 roślin w każdym wazonie), celem zbadania charakteru brodawkowania ich korzeni. Stwierdzono, że szczep *A* wywoływał tworzenie się dużych narośli zgrupowanych w górnej części głównego korzenia, natomiast szczep *P* dawał brodawki drobne, białe i rozsiane po całym systemie korzeniowym.

Wszystkie rośliny wyjmowano z wazonów w okresie pełnego kwitnienia, suszono i oznaczano w nich ogólną zawartość azotu. Miernikiem ilości azotu przyswojonego symbiotycznie przez rośliny poszczególnych serii był azot roślin serii III, niezakażonej (karmionej wyłącznie azotem mineralnym).

Wyniki naszych badań wskazują na to, że: 1) Żadna ze stosowanych dawek azotu nie wpłynęła na wzmocnienie aktywności symbiozy ze szczepem *A* lub *P* (tabela I), przy tym wzrastające dawki azotu stopniowo coraz to silniej hamowały brodawkowanie korzeni, zarówno w serii zakażonej szczepem aktywnym jak i nieaktywnym; 2) Zwiększona dawka K_2O (750 mg K_2O na wazon) wpłynęła dodatnio na energię wiązania wolnego azotu u szczepu *A* (w wyższym stopniu) i u szczepu *P* (w niższym stopniu), ale tylko w tych seriach, w których głównym źródłem azotu dla roślin był azot wolny, a więc przy najmniejszej „głodowej" dawce azotanu amonowego (50 mg N na wazon) (tabela II); 3) W warunkach naszego doświadczenia dolistne stosowanie roztworu sacharozy nie wpłynęło dodatnio na aktywność symbiozy ze szczepem *P*.

Tabela III

Wpływ mieszaniny szczepów *A*+*P* *Rhizobium trifolii* na rozwój koniczyny (zbiór w okresie przed zakwitaniem)

The effect of mixture of 2 *Rhizobium trifolii* strains upon the growth of red clover (harvested before the flowering stage)

Szczepy *Rhizobium* *Rhizobium* strains	Plon roślin na wazon Yield of plants per pot g	Plon na wazon Total yield per pot N mg
A — aktywny active	3,63 ± 0,06	124
P — nieaktywny inactive	2,11 0,14	63
A+*P* szczepy mieszane mixture of strains	3,40 0,13	115

W osobnej serii doświadczenia stosowano równoczesne zakażanie roślin hodowlami szczepów *A*+*P*. Wyniki tych badań wskazywałyby na to,

że szczep aktywny był wówczas szczepem dominującym; świadczą o tym plony roślin i zawartość w nich ogólnego azotu, prawie równe plonom uzyskanym przy szczepieniu roślin tylko szczepem *A* (tab. III).

Rozpoczęto badania nad możliwościami transformacji szczepu aktywnego w nieaktywny i *vice versa*.

A. Nowotny-Mieczyńska and *J. Zinkiewicz*

THE SYMBIOTIC EFFECTIVENESS OF *RHIZOBIUM TRIFOLII*, AS INFLUENCED BY THE NUTRITION OF THE HOST PLANT

Summary

Nutman and other investigators have shown, that the host plant-organism can influence the effectiveness of its rhizobial symbiont during their symbiosis and that therefore the host plant participate in some way in the fixation process of atmospheric nitrogen.

The authors of this paper have tried to increase the effectiveness of an almost ineffective strain of *Rhizobium trifolii* through some external factors i. e. some changes in the nutrition of the host plant.

For this purpose, red clover was grown on washed and sterilised sand (10 kg per pot) and inoculated with a 1), very active strain of *Rhizobium trifolii* (strain *A*), with an 2), ineffective one (strain *P*); an uninoculated control has been added.

No positive influence of mineral nitrogen has been noted upon the nitrogen fixing power of clover inoculated with both investigated strains (table I). Mineral nitrogen (as NH_4NO_3), esp. in quantity of 500 mg N per pot, supressed the nodules formation by the active (*A*) as well by the inactive (*P*) strains.

The influnce of potassium fertiliser has been studied. Two levels of K_2O (as $K_2SO_4 + KCl$) have been applied: 500 mg and 750 per pot. The increased dose of K (750 mg K_2O pot) influenced positively the growth and nitrogen fixing power of red clover inoculated with the effective as well with the ineffective strain — but only when the plants have been fed with very small quantities of mineral nitrogen (50 mg *N* per pot) (table II).

Foliar application of saccharose did not influence the N-fixing power of both strains.

The response of red clover inoculated with the above cited strains of *Rhizobium trifolii*, applied separately and together (*A* + *P*) was examined. The amount of nitrogen fixed per pot in each series shows the domination of the active strain *A* over the inactive strain *P* (table III).

DYSKUSJA

J. Ziemięcka

Czy zaobserwowano działanie *Rhizobium* i innych bakterii na zewnątrz korzeni i czy nie następowało tu ogładzanie roślin przez bakterie, zbierające się na korzeniach w warunkach niesterylnych?

Odpowiedź autorek:

Mikroflorą rizosfery nie zajmowano się.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1959, 8 : 315—318

Z. Uziakowa

WPŁYW RÓŻNYCH FORM AZOTU NA ROZWÓJ I SYMBIOZĘ SOI

Doniesienie

Z Zakładu Fizjologii Roślin WSR w Lublinie

W dwuletnim (1956-1957) doświadczeniu wazonowym prowadzono badania nad wpływem różnych form azotu na rozwój soi zaszczepionej aktywnym szczepem *Rhizobium japonicum*. Doświadczenia te prowadzono w hali wegetacyjnej IUNG w Puławach. Badano działanie następujących form azotu: mocznik, azotany i sole amonowe. Wyniki badań porównywano z wynikami serii kontrolnej, tj. tej serii, w której źródłem azotu był tylko azot cząsteczkowy. Celem uniknięcia działania kationów przy stosowaniu soli azotanowych i anionów przy stosowaniu soli amonowych, używano czysty kwas azotowy i czysty amoniak jako źródło azotu, starając się jednak o utrzymanie kwasowości środowiska odżywczego roślin na możliwie jednolitym poziomie dla całego doświadczenia (*pH* 7-7.3).

Wszystkie serie doświadczenia otrzymały całkowitą pożywkę mineralną w optymalnych ilościach i proporcjach. Zmiany jakościowe dotyczyły tylko pożywki azotowej a zmiany ilościowe pożywki potasowej. Potas dawano po 500 mg i 750 mg K_2O na wazon. Pożywkę azotową podawano roślinom albo w trzech dawkach po 170 mg N na wazon, przy siewie, w trzy tygodnie i w sześć tygodni po siewie, albo też co drugi dzień w 30-35 dawkach po 10-15 mg N na wazon. W sumie każdy wazon otrzymał azot w ilości nie przekraczającej 500 mg N na 10 kg czystego piasku.

W doświadczeniu w 1957 r. stosowano dodatkowe nawożenie potasem (250 mg K_2O, czyli w sumie 750 mg K_2O na wazon) lub dolistne dokarmianie roślin roztworem sacharozy (stężenie 0,5-1,0%).

W sezonie wegetacyjnym w 1956 r. zebrano rośliny z 4 wazonów każdej serii (w każdej serii było po 8 wazonów, w wazonie po 3 rośliny) już w okresie poprzedzającym ich kwitnienie, oznaczając równocześnie stan brodawkowania korzeni. Resztę roślin zebrano w okresie dojrzewania nasion. W następnym sezonie wegetacyjnym zbierano rośliny tylko w okresie dojrzewania nasion.

Wyniki badań były następujące:

1. Różnice w oddziaływaniu różnych form azotu przy różnym sposobie dawkowania związków azotowych były we wczesnym okresie wegeta-

Tabela I

Wpływ różnych form azotu na rozwój soi

The effect of different forms of nitrogen upon the growth of soy-beans

Serie Series	Forma azotu Forms of N	Wielkość jednorazowej dawki N dosis of given N mg	Doświadczenie — Experiment 1956 r.												Doświadczenie Experiment 1957 r.		
			Rośliny zebrane przed kwitnieniem Plants harvested before the blooming period							Rośliny zebrane w okresie dojrzałym Plants harvested at the maturity stage							
			pH podłoża pH of substrate	P. sucha masa a. d. matter g	względny plon relative yield	Ogólny N Total N mg	względny plon relative yield	Brodawki Nodules g	względny plon relative yield	pH podłoża pH of substrate	P. sucha masa a. d. matter g	względny plon relative yield	Ogólny N Total N mg	względny plon relative yield	pH podłoża pH of substrate	P. sucha masa a. d. matter g	względny plon relative yield
1	Kontrola N_2		7,5	9,89 ± 0,05	100	439	100	1,49	100	6,9	48,50 ± 1,00	100	2289	100	7,1	34,10 ± 0,84	100
2	$+NH_4NO_3$	170	7,1	18,00 ± 0,70	182	574	131	0,96	64	6,6	54,60 ± 1,02	112	2314	101	6,7	35,00 ± 1,95	102
3	$+NH_4NO_3$	10—15	6,9	12,61 ± 0,71	128	432	99	0,99	64	6,7	49,35 ± 1,66	102	1307	109	6,9	35,19 ± 1,09	103
4	$+HNO_3$	170	7,1	16,94 ± 1,16	170	536	122	0,86	58	6,7	48,31 ± 1,24	100	1881	72	7,0	22,24 ± 0,35	65
5	$+HNO_3$	10—15	7,3	13,28 ± 0,43	134	413	94	0,65	44	6,5	51,25 ± 1,72	106	2229	97	6,8	32,05 ± 0,77	93
6	$+NH_4OH$	170	7,3	8,77 ± 0,87	89	342	78	0,79	53	6,9	26,39 ± 1,16	54	941	41	7,3	22,28 ± 1,88	65
7	$+NH_4OH$	10—15	7,3	13,22 ± 1,07	133	396	90	0,30	20	6,8	48,14 ± 1,26	99	2086	91	7,5	27,60 ± 1,10	81
8	$+CO(NH_2)_2$	170	7,5	17,05 ± 1,75	173	622	142	1,13	76	6,7	53,14 ± 1,11	118	2729	119	7,2	27,54 ± 2,10	81
9	$+CO(NH_2)_2$	170													6,9	43,81 ± 0,86	137
10	$+CO(NH_2)_2$ +sacharoza**	170													6,9	51,16 ± 0,32	150
11	$+CO(NH_2)_2$ +250 mg K_2O*	170													6,9	49,55 ± 1,10	145

* Zwiększona dawka K_2O 750 mg na wazon
Increased dose of K_2O per pot

** Dolistne stosowanie w stężeniu 0,5%—1% sacharozy
Foliar application in concentration

cyjnym (1956) o wiele jaskrawsze niż pod koniec wegetacji. Już w pierwszych tygodniach wyróżniały się wzrostem i intensywnym zielonym zabarwieniem rośliny nawożone kwasem azotowym. Dorównywały im rośliny karmione azotanem amonowym. W seriach z mocznikiem natomiast początkowy wzrost był nieco zahamowany, później jednak nastąpił bardzo szybki i bujny rozwój roślin. Pod koniec wegetacji różnice stopniowo zacierały się. Być może, że rośliny powoli przystosowywały się do różnych form i dawek azotu.

2. Najlepszym źródłem azotu dla soi, w warunkach naszego doświadczenia, okazał się mocznik. Drugie miejsce pod tym względem zajmował jon azotanowy, najgorsze natomiast wyniki otrzymywano przy stosowaniu jonu amoniakalnego. Występowały przy tym znaczne różnice w zależności od sposobu dawkowania amoniaku. Silniejsze koncentracje tego związku działały silnie hamująco na rozwój roślin.

3. Porównując sposób dawkowania związków azotowych stwierdzono, że często podawane małe porcje korzystniej wpływały na rozwój roślin niż trzykrotne wprowadzanie odpowiednio większych porcji. Różnice te występowały najwyraźniej w okresie dojrzewania roślin, przy tym najostrzej zaznaczały się przy stosowaniu amoniaku, a mniej ostro przy stosowaniu mocznika i kwasu azotowego. Nie stwierdzono takiej zależności przy karmieniu roślin azotanem amonowym. Najwidoczniej produkowane α-ketokwasy wiązały stopniowo podawane roślinie małe porcje azotu, gdy tymczasem duże dawki, nie znajdując akceptorów, zatruwały roślinę.

4. Wybitnie dodatnie działanie mocznika w naszym doświadczeniu w 1957 r. należy, być może, przypisać zawartości w soi dużej ilości ureazy, powodującej stopniowe uwalnianie z mocznika łatwo przyswajalnego azotu.

5. Stosowanie zwiększonych dawek potasu lub dolistne dokarmianie soi roztworem sacharozy wpłynęło dodatnio na wykorzystanie przez roślinę dużych dawek mocznika. Natomiast analogiczne stosowanie soli potasu lub też sacharozy w serii z dużymi dawkami amoniaku nie miało żadnego wpływu na rozwój soi.

6. Stan brodawkowania korzeni soi (badany w doświadczeniu 1956 r. w okresie poprzedzającym kwitnienie roślin) był we wszystkich seriach doświadczenia znacznie słabszy niż w serii kontrolnej. Brodawkowanie korzeni było najsilniej hamowane przez amoniak stosowany w małych dawkach. Również kwas azotowy podawany w małych porcjach wpływał bardziej hamująco na tworzenie się brodawek niż podawany dużymi dawkami.

7. W sezonie wegetacyjnym 1957 r. w okresie kwitnienia soi prowadzono orientacyjne badania metodą chromatografii krążkowej na zawartość wolnych aminokwasów w roślinach. Stwierdzono, że glutamina

występuje w roślinach w dużych ilościach bez względu na formę pokarmu azotowego. W roślinach, gdzie źródłem azotu był amoniak lub mocznik, stwierdzono oprócz glutaminy obecność asparaginy, argininy i lizyny. W serii kontrolnej (N_0) i serii z kwasem azotowym jako źródłem azotu nie zaobserwowano obecności lizyny.

Z. Uziakowa

THE INFLUENCE OF DIFFERENT FORMS OF NITROGEN-NUTRITION UPON THE GROWTH AND SYMBIOSIS OF SOY-BEAN

Summary

The effect of different forms of nitrogen source: liquid ammonia, nitrate and urea upon the growth of soy-bean, inoculated with *Rhizobium japonicum* on sand in pot cultures, was examined. The nitrogen source (500 mg N per pot) was added either in three equal doses or in 30-35 small doses (10-15 mg N) every second day.

Growth of plants fertilized with urea was better than those receiving nitrate or ammonia. The inhibition of root-nodule formation was most marked in plants grown on ammonia. The nitrogen nutrition of the plants applied in frequent but small portions, seemed to be much more efficient, than in the case of three large portions.

It was shown by paper chromatography method that in plants fertilized with nitrates there is no lysine in cell sap.

DYSKUSJA

J. Ziemięcka

Przy prowadzeniu przez Ziemięcką i Gołębiowską (1938) doświadczeń nad żywieniem lucerny azotem mineralnym stwierdzono, że plon lucerny karmionej azotem cząsteczkowym lub azotem w formie azotanów był taki sam, o ile poprzez odpowiednie dawkowanie azotu mineralnego imitowano tempo pobierania wolnego azotu z powietrza. Pytanie: 1) Czy próbowano oprócz żywienia amoniakiem stosować żywienie roślin gotowymi aminokwasami? 2) W jakim celu stosowane były tak duże dawki azotu mineralnego? 3) Czy próbowano zwiększać lub zmniejszać nasilenie fotosyntezy dla porównania z dokarmianiem cukrem? 4) Czy przewiduje się oznaczanie ilości chlorofilu w roślinach jako czynnika wpływającego na nasilenie symbiozy?

J. Gołębiowska

Badacz szwedzki Nilson z współpracownikami (1954) stwierdził, że nie ma różnić w składzie aminokwasowym roślin współżyjących z *Rhizobium* i karmionych azotem azotanowym. W jego badaniach wystąpiła tylko różnica ilościowa, wyrażająca się silniejszą reakcją z ninhydryną przy aktywnej symbiozie.

Odpowiedź autora:

Oprócz żywienia mocznikiem próbowano rośliny żywić aminokwasami. W 1956 r. jedną serię roślin żywiono asparaginą, dawkując ją w 3 porcjach. Stwierdzono, że

asparagina wpływała hamująco na wzrost roślin w początkowym okresie wegetacji i dopiero w późniejszym okresie wzrost i rozwój roślin były lepsze. Usiłowano również zmniejszać nasilenie fotosyntezy dla uwidocznienia wpływu dokarmiania cukrem, przez zacienianie roślin co drugi dzień. Stwierdzono, że serie ze zmniejszonym nasileniem fotosyntezy były wyraźnie opóźnione w rozwoju, przy czym zjawisko to występowało najsilniej w serii żywionej amoniakiem. Podobne wyniki uzyskano w doświadczeniu z żywieniem pomidorów różnymi formami azotu. Duże dawki azotu podawane w trzech terminach stosowano dla utrzymania równowagi między nawożeniem azotowym a nawożeniem innymi składnikami, dawanymi również w trzech porcjach. Należy jednak nadmienić, że duże dawki azotu w postaci kwasu azotowego nie wpływały ujemnie na rośliny i że jedynie duże dawki amoniaku działały hamująco na wzrost i rozwój roślin.

A. Mieczyńska

W uzupełnieniu odpowiedzi autorki można dodać, że w omawianych doświadczeniach działanie amoniaku można by nazwać „względnie ujemnym". Wzrost i rozwój roślin żywionych amoniakiem byłyby prawdopodobnie lepsze, gdyby amoniak był stosowany w jeszcze mniejszych dawkach.

Oznaczanie ilości chlorofilu w roślinach nie byłoby celowe, natomiast ciekawe byłoby porównanie składu aminokwasowego roślin szczepionych szczepem aktywnym, nieaktywnym i żywionych różnymi formami azotu.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1959, 8 : 321—332

T. Wróbel

WYRÓB SZCZEPIONEK I WYNIKI SZCZEPIENIA NIMI ROŚLIN MOTYLKOWYCH

Referat przeglądowy

Z Zakładu Mikrobiologii Rolniczej Instytutu Uprawy, Nawożenia i Gleboznawstwa w Puławach

Szczepienie roślin motylkowych bakteriami symbiotycznymi jest zabiegiem znanym od końca ubiegłego wieku. Dzisiaj stosuje się je na dużą skalę w różnych krajach, co wynika z ulepszenia procesów wyrobu szczepionek i z doświadczalnego wykazania, że szczepionki te przy umiejętnym ich stosowaniu znacznie podnoszą plony roślin pod względem ilościowym i jakościowym.

W referacie naszym zamierzamy opisać aktualny stan: 1) sposobu przygotowania szczepionek *Rhizobium*, łącznie ze sposobem ich stosowania, 2) wyników szczepienia bakteriami różnych roślin motylkowych, podając głównie wyniki badań polskich.

PRZYGOTOWANIE SZCZEPIONEK *RHIZOBIUM*

Tak samo jak przy wyrobie szczepionek dla innych celów, wyrób skutecznie działających szczepionek *Rhizobium* polega na: a) selekcji i hodowli szczepów macierzystych tej bakterii, b) rozmnożeniu wybranych szczepów na odpowiednich do tego podłożach, c) umiejętnym przechowywaniu gotowych szczepionek, d) kontrolowaniu wartości szczepów macierzystych i otrzymanych z nich szczepionek.

SELEKCJA SZCZEPÓW *RHIZOBIUM*

Celem tej selekcji jest wybranie takich szczepów *Rhizobium*, które mają zdolność przenikania do korzeni właściwego im roślinnego partnera i wiązania dużych ilości wolnego azotu w wytworzonych pod ich wpływem brodawkach korzeniowych a więc szczepów dostatecznie wirulentnych i aktywnych.

Według licznych doświadczeń zagranicznych i naszych własnych najlepiej jest wyodrębniać *Rhizobium* z narośli korzeniowych w okresie dużego nasilenia symbiotycznego wiązania azotu, a więc podczas zawiązywania pąków kwiatowych lub podczas kwitnienia. Brodawki, z których chcemy uzyskać dobry szczep bakterii, powinny być dobrze rozwinięte i odżywione oraz zaopatrzone w czerwony pigment — leghemoglobinę. W celu wybrania najaktywniejszych szczepów z kolekcji, więc dla dokonania selekcji potrzebnej dla celów produkcyjnych, posługujemy się, jak wiadomo, przede wszystkim metodą wegetacyjną. Porównujemy w doświadczeniach laboratoryjnych (w probówkach z agarem), wazonowych i następnie poletkowych wpływ poszczególnych szczepów na szybkość wzrostu zaszczepionych nimi roślin, na wysokość ich plonów i na zawartość w nich azotu. Ta bezpośrednia metoda oceny wartości szczepów przy umiejętnym jej wykonaniu jest bez wątpienia najbardziej pożyteczna. Ma jednak ten brak, że na postawienie diagnozy wartości szczepu musimy czekać kilka miesięcy, a te kilka miesięcy okresu wegetacyjnego — to strata nieraz całego roku dla producenta szczepionek, który nie może ryzykować ich wyrobu z niezbadanego szczepu. Wprawdzie mając do dyspozycji szklarnie z urządzeniami klimatyzacyjnymi, można dokonać pracy selekcyjnej do wiosny, czego przykładem może być kontrola szczepów *Rhizobium* wykonywana obecnie w Rothamsted w ciągu 80 dni zimy. Zawsze jest to jednak bardzo długi termin.

Dlatego też od szeregu lat prowadzone są badania nad znalezieniem równie pewnych, ale szybszych metod dla określania wartości poszczególnych szczepów. Metody te są też bardzo potrzebne do kontrolowania szczepionek produkcyjnych, które nie zawsze bywają bezbłędnie wykonane oraz do selekcji aktywnych szczepów *Rhizobium*.

Różni badacze współcześni opracowują szybkie metody określania wartości poszczególnych szczepów *Rhizobium* na podstawie oznaczenia tych cech bakterii, które są sprzężone z ich aktywnością asymilacyjną. A więc np. oznaczania nasilenia i charakteru brodawkowania roślin (Helcer i Jewtiejewa 1948), zawartości hemoglobiny w brodawkach (Virtanen i współpracownicy 1947, Jordan i Garard 1951), wysokości potencjału oksydoredukcyjnego w czystych hodowlach *Rhizobium* (Rabotnowa 1941), lub w soku korzeniowym roślin (Kłosowska 1952, Jakowlewa 1957). Kobus (1952) badał też własności morfologiczne i fizjologiczne szczepów *Rhizobium* o różnej aktywności. Nie znalazł jednak zależności między tymi własnościami i aktywnością. Heumann (1952 a i b) znalazł zależność pomiędzy ilością bakteroidów występujących w brodawkach i zawartością hemoglobiny. Na specjalną uwagę zasługują opublikowane w 1957 r. badania Wieringi i Bakhuis. Według tych autorów metodą chromatograficzną można określić już w początkach

symbiozy grochu (3-4 tygodnie) różnice w aktywności szczepów na podstawie rodzaju aminokwasów w soku roślin. Stwierdzili oni mianowicie na podstawie chromatogramów, że w roślinach nie szczepionych lub szczepionych szczepami nieaktywnymi występował zwykle tylko kwas asparaginowy, podczas gdy w soku roślin zakażonych szczepami aktywnymi stwierdzili obok kwasu asparaginowego asparaginę, glutaminę, hydroksyprolinę i treoninę oraz substancje podobne do waliny i leucyny. Badania te, poza zastosowaniem tej metody do selekcji aktywnych szczepów *Rhizobium*, mogą być także przydatne dla wyjaśnienia procesu powstawania aminokwasów w brodawkach.

W naszej pracy (W r ó b e l 1956-1958), poświęconej poszukiwaniu prostszych i szybszych metod określania aktywności *Rhizobium* podczas jego współżycia z rośliną motylkową, zwróciliśmy uwagę na następujące cechy: charakter brodawkowania, potencjał oksydoredukcyjny soku korzeniowego, morfologia bakteroidów oraz energia oddychania młodych roślin i brodawek. Dotychczas stwierdzono, że charakter brodawkowania (ilość, wielkość, rozmieszczenie i ciężar brodawek) nie może być przyjmowany jako kryterium określania aktywności szczepow. Brodawkowanie zależy także od wielu czynników zewnętrznych, np. od typu gleby (W r ó b e l, G o ł ę b i o w s k a 1956). Mniej aktywne szczepy *Rh. leguminosarum* wykazywały niższy potencjał oksydoredukcyjny niż szczepy aktywne. Na podstawie naszych pomiarów oddychania młodych roślin koniczyny i seradeli w aparacie Warburga wynikałoby, że zużycie tlenu jest większe u roślin zaszczepionych szczepami aktywnymi niż nieaktywnymi. Praca ta ma być jeszcze rozszerzona.

HODOWLA SZCZEPÓW MACIERZYSTYCH

Duża zmienność szczepowa *Rhizobium*, jego wrażliwość na środowisko jest rzeczą znaną od dawna. Toteż dla utrzymania dobrej wartości wyselekcjonowanego szczepu musimy go hodować na odpowiednich dla niego podłożach, w uregulowanej temperaturze itp.

Rodzaj pożywienia węglowego oraz źródła witamin, aminokwasów i ciał wzrostowych mogą mieć, jak wiadomo, znaczny wpływ na właściwości szczepów *Rhizobium*.

Szczepy hodowane przez nas na pożywkach z dodatkiem sacharozy rosły na nich dużo słabiej niż na glikozie i mannitolu i nawet traciły aktywność. Bardzo wyraźnie zaznaczył się np. wpływ sacharozy na spadek aktywności *Rh. meliloti* (G o ł ę b i o w s k a 1952 a).

Jako odpowiednie i tanie źródło węgla dla hodowli *Rhizobium* i przede wszystkim do rozmnażania tych bakterii przy produkcji szczepionek wybraliśmy po wielu próbach syrop ziemniaczany, zawierający około 40%

glikozy. W szczególności podczas badań autora niniejszego referatu rozwój różnych szczepów *Rhizobium* był na syropie ziemniaczanym nieco słabszy niż na mannitolu, ale lepszy niż na pożywkach z glikozą. Następnie w 3-letnich doświadczeniach wazonowych porównano aktywność szczepów hodowanych na wymienionych pożywkach. We wszystkich wypadkach wzrost i plon roślin oraz zawartość w nim azotu były równe albo nawet większe w roślinach zaszczepionych szczepami hodowanymi kilka lat na syropie niż szczepionych tymi samymi szczepami przechowywanymi na pożywkach z glikozą.

Badania nad składem pożywek i nad innymi warunkami hodowli *Rhizobium* były liczne. Spomiędzy nich zacytujemy tutaj, że za najodpowiedniejszy substrat energetyczny uważany jest nadal mannitol i za najpełniejsze źródło witamin, aminokwasów i ciał wzrostowych — woda drożdżowa (Albrecht i Mc Calla 1937, Schmidt 1947 i inni). W ZSRR hoduje się *Rhizobium* na pożywkach z sacharozą z dodatkiem wyciągów z grochu lub fasoli (Fiodorow 1952).

Według Fiodorowa (1952) optymalne *pH* pożywek powinno wynosić — zależnie od gatunku *Rhizobium* — 6,0-7,8. Allenowie (1958) za najlepszą temperaturę inkubacji uważają 25-30°. Do innych szczegółów hodowlanych nie wprowadzono w ostatnich latach zasadniczych zmian.

PRZECHOWYWANIE SZCZEPÓW MACIERZYSTYCH — PRÓBY LIOFILIZACJI

Ponieważ częste przeszczepianie dużych kolekcji szczepów macierzystych jest rzeczą żmudną, w pracowni naszej rozpoczęliśmy próby przechowywania hodowli *Rhizobium* w stanie zliofilizowanym. Oparliśmy się przy tym na danych Appelmana i Searsa (1946), którzy stwierdzili, że liofilizowane bakterie nie traciły zdolności wzrostu i wytwarzania brodawek na roślinach nawet po 3-4 latach przechowywania w tym stanie.

W Puławach w ciągu 3 lat sprawdzano w doświadczeniach wazonowych aktywność 6 szczepów *Rh. lupini* przechowywanych w stanie zliofilizowanym w porównaniu ze szczepami stale przechowywanymi na pożywce agarowej. W większości wypadków liofilizacja nie zmniejszała aktywności tych szczepów.

W poszukiwaniu odpowiedniejszego niż surowica podłoża do liofilizacji *Rhizobium* użyliśmy w 1957 r. oprócz surowicy roztworów mannitolu, glikozy i sacharozy z 1% żelatyny. Próby przeprowadzono na *Rh. meliloti*. Z obserwacji doświadczeń wazonowych w roku bieżącym wydaje się, że *Rh. meliloti* zregenerowane z liofilizatów na mannitolu, sacharozie lub surowicy zachowuje swą aktywność. Tylko szczep liofilizowany na glikozie był wyraźnie mniej aktywny. Prace te mają być nadal kontynuowane.

Bonnier (1955) w przeciwieństwie do Nutmana (1946) uważa, że szczepy mogą być przechowywane w sterylnej glebie i że nie tracą przy tym aktywności. Miałoby to doniosłe znaczenie dla konserwowania *Rhizobium* w tym naturalnym środowisku, podobnie jak to się robi ze szczepami promieniowców używanych przy produkcji antybiotyków. Te ostatnie są przechowywane w glebie sterylnej albo w liofilizatach glebowych (wytwórnia w Tarchominie).

WYRÓB SZCZEPIONEK I ICH KONTROLA

Szczepionki dla roślin motylkowych są produkowane przez wiele krajów Europy i w USA. Według danych opublikowanych w monografii Freda, Baldwina i Mc Coy, (1932) około 1930 r. było w Stanach Zjednoczonych ponad 30 firm produkujących szczepionki. Obecnie kontrolą produkowanych w USA szczepionek zajmują się specjalni inspektorzy Departamentu Rolnictwa, którzy wykupują na rynku pewną ilość preparatów i przekazują je do zbadania stacjom rolniczym podległym Departamentowi (Hofer i Little 1955, Hofer i Kirk 1956). Sprawdza się tam ich aktywność i wirulentność, podobnie jak szczepów macierzystych. Według raportów Stacji Rolniczo—Doświadczalnej w Geneva (USA), 95-100% szczepionek *Rhizobium* produkowanych w USA było aktywnych.

Na podstawie zebranych przez nas danych, w krajach Europy Zachodniej: w Anglii, Belgii, Francji, Holandii i Danii szczepi się przeważnie lucernę i w niewielkiej ilości koniczynę, w Szwecji — koniczynę i lucernę.

W ZSRR po raz pierwszy zaczęto stosować nitraginę w 1928 r. (Rudakow 1951). Już w 1929 r. zastosowano tam szczepienie soi na 200 000 ha, a w ostatnich latach stosuje się ten zabieg na przeszło 2 milionach ha różnych upraw roślin motylkowych. Przeprowadzono tam także cały szereg prób z tzw. szczepionkami „gospodarczymi" wyrabianymi w obiektach rolniczych z roztartych korzeni roślin motylkowych albo z roztartych brodawek otrzymanych z tzw. „szkółek bakteryjnych" (Helcer i Jewtiejewa 1948). Próbuje się też dodawać do szczepionek *Rhizobium* bakterie „aktywatory" (Krasilnikow i Koreniako 1944). Standartem dla nitraginy radzieckiej (Rudakow, 1951) jest obecność w 1 g szczepionki glebowej minimum 100 milionów bakterii szybko rosnących i 50 milionów na 1 g bakterii wolno rosnących. Dopuszczalne zanieczyszczenia szczepionki innymi bakteriami wynoszą do 10%.

W Czechosłowacji produkowano szczepionki początkowo na glebie, później na żelu krzemionkowym, ostatnio znów powrócono do używania podłoża glebowego.

W Polsce od dość dawna były podejmowane próby uruchomienia produkcji szczepionek dla roślin motylkowych. Przez krótki okres czasu, już w 1920 r. przygotowywała je na niewielką skalę firma Krzyżankiewicza

w Poznaniu, a następnie firma Klawe. Przed wojną Instytut puławski wytwarzał także niewielkie ilości tych szczepionek. W czasie ostatniej wojny przygotowywano je w Zakładzie prof. Bujwida w Krakowie. Po wojnie, w 1951 r. robiono pod kierunkiem Działu Mikrobiologii w Puławach szczepionki płynne dla koniczyny i lucerny na kilka tysięcy hektarów ich upraw.

W roku 1954 z inicjatywy Działu Mikrobiologii Instytutu Uprawy. Nawożenia i Gleboznawstwa została uruchomiona i zorganizowana przez byłe Ministerstwo Państwowych Gospodarstw Rolnych Wytwórnia Nitraginy w Wałczu, w woj. koszalińskim. W Wytwórni tej ze szczepów macierzystych dostarczonych przez pracownię puławską przygotowuje się obecnie szczepionki dla różnych roślin: dla lucerny i nostrzyku, koniczyny, łubinu, seradeli, grochu, wyki, peluszki, bobiku i soi. Największe zapotrzebowanie jest na szczepionki dla łubinu, lucerny i koniczyny. W przyszłości w miarę zapotrzebowań przewiduje się wyrób szczepionek dla rzadziej uprawianych w Polsce roślin motylkowych jak: esparceta, przelot, komonica i inne.

TECHNOLOGIA WYROBU SZCZEPIONEK

Istnieją różne sposoby wyrobu szczepionek. W USA przygotowuje się je na pożywkach agarowych lub na podłożu z torfu. W większości krajów Europy Zachodniej używa się zwykle jako podłoża agaru. W Holandii (van Schreven i inni 1953 i 1954) opracowano metodę przygotowywania szczepionek (głównie dla lucerny) na glebie piaszczystej z dodatkiem torfu, $CaCO_3$ i mączki lucernianej. W podłożu takim, wg autorów, komórki *Rhizobium* mnożą się dobrze i są bardzo żywotne. Ilość ich może dochodzić do 20 miliardów na 1 g takiej szczepionki.

W ZSRR, Czechosłowacji i Polsce szczepionki są obecnie przygotowywane na podłożu glebowym.

PRODUKCJA NITRAGINY POLSKIEJ

Szczepionka nasza jest obecnie wyrabiana na odpowiednio dobranej glebie piaszczystej. Szczepy macierzyste dostarczane wytwórni przez Dział Mikrobiologii rozmnaża się na miejscu w wytwórni w płynnej pożywce z wodą drożdżową i z syropem ziemniaczanym. W 1958 r. skrócono czas namnażania *Rhizobium* w płynnych hodowlach przez nawietrzanie ich w 50 litrowych tankach. Obecnie czas ich hodowli wynosi 48-72 godzin. Bakterie rozmnożone w hodowlach płynnych dodaje się następnie do wyjałowionej gleby, gdzie mnożą się dalej przez okres 1-2 dni w temperaturze około 26°. Każda porcja gotowej nitraginy powinna zawierać ilość bakterii potrzebną do zaszczepienia nasion na 1 ha. Nitragina z Wałcza ma po kilkaset milionów do kilkunastu miliardów komórek *Rhizobium* na 1 g.

Kontrola gotowej nitraginy jest prowadzona na miejscu i przez Dział Mikrobiologii IUNG. Sprawdzanie aktywności szczepionek wykonuje się w doświadczeniach wazonowych w Gorzowie i w Puławach. Doświadczenia te prowadzone w latach 1956 i 1957 z nielicznymi wyjątkami wykazały na ogół działanie nitraginy na plony roślin równie skuteczne, jak macierzystej szczepionki puławskiej.

Prowadzone są nadal badania zmierzające do ulepszenia (B e r e ś n i e w i c z ó w n a) i potanienia nitraginy polskiej. Między innymi robione są w Walczu próby zastąpienia gleby torfem. Żel krzemionkowy okazał się nieprzydatny jako podłoże.

WYNIKI DOŚWIADCZEŃ POLOWYCH ZE SZCZEPIENIEM ROŚLIN MOTYLKOWYCH

Zanim przystąpimy do omówienia wyników stosowania szczepionek w Polsce, zobaczmy jak sprawa ta wygląda w innych krajach.

W Kanadzie przeprowadzono przeszło tysiąc doświadczeń polowych nad wpływem szczepionek *Rhizobium* na plony. Dodatnie wyniki uzyskano w około 70% doświadczeń. Najsilniej reagowała na szczepienie lucerna.

Według ostatnich danych M a n i l a i B o n n i e r a (1955) w Belgii szczepi się całą uprawianą tam lucernę i uzyskuje się średnio zwyżkę plonów powyżej 20%. W niektórych rejonach zwyżka ta wynosiła od 50 do 120%. Według kalkulacji handlowej, czysty zysk ze stosowania tego zabiegu jest w Belgii oceniany na kilka milionów franków belgijskich. Wytwarzane są też tam szczepionki dla koniczyny.

W Anglii po wojnie stosuje się głównie szczepionki dla lucerny. Otrzymane zwyżki plonów siana wahają się w granicach 5-230%.

W Szwecji (B j ä l f v e 1949), gdzie szczepi się głównie lucernę i koniczynę, w latach 1914-1948 uzyskano 99% wyników dodatnich w doświadczeniach z lucerną i 97% — z koniczyną. Przyrosty plonów lucerny wahały się w granicach 15-900%, koniczyny — 3-300%.

W Holandii (v a n S c h r e v e n 1954) uzyskuje się średnio 16% zwyżki plonów lucerny. Stwierdzono przy tym znaczne zwiększenie się zawartości białka w sianie tej rośliny.

We Francji (D e m o l o n 1951) szczepienie lucerny dawało wzrost plonów o około 40%.

W Szwajcarii G i s i g e r (1954) prowadził w latach 1946-1953 doświadczenia polowe z koniczyną i lucerną. Szczepienie koniczyny nie dawało na ogół dodatnich wyników. U lucerny stwierdził on przyrosty plonów w granicach 10-30%. Autor używał szczepów z Anglii, Francji i Szwecji. Najlepsze były szczepionki przygotowane ze szczepów szwedzkich.

W Czechosłowacji (H l a v a č k o v a i współpracownicy 1956) naj-

lepsze wyniki uzyskano przy szczepieniu soi, lucerny i łubinu. Przyrost plonu dla wszystkich tych roślin wynosił 3-25%.

W ZSRR wg Rudakowa (1951), Bieriozowej i współpracowników (1955) otrzymuje się zwyżki plonów w około 75% doświadczeń. Przyrosty te wynoszą średnio dla poszczególnych roślin 7-60%. Najlepsze wyniki uzyskuje się na glebach świeżo zagospodarowanych.

W Polsce produkcja szczepionek została poprzedzona licznymi doświadczeniami polowymi, w których sprawdzano skuteczność zabiegu szczepienia naszymi szczepionkami na różnych uprawianych roślinach motylkowych. Doświadczenia te prowadzone są nadal we współpracy z Zakładami Doświadczalnymi i z Inspektoratami Doświadczalnictwa Terenowego w całym kraju. Poza doświadczeniami ścisłymi (4-6 powtórzeń) prowadzi się także obecnie proste doświadczenia łanowe i obserwacyjne.

Pierwsze prace nad szczepieniem roślin motylkowych w Polsce rozpoczął Bassalik w r. 1919. W wyniku rozpoczętych w Puławach w 1932 r. doświadczeń ze szczepieniem lucerny i soi Marszewska-Ziemięcka i współpracowniczki (1937) znalazły dodatni wpływ szczepienia na te rośliny. W 1934 r. wyniki swoich badań podał też Śnieszko.

Po wojnie organizowane przez Puławy doświadczenia zostały wznowione (Gołębiowska 1952b, Gołębiowska i Wróbel 1955). Wyniki doświadczeń przeprowadzonych w latach 1948-1957 zostały zestawione w tabeli I.

Biorąc pod uwagę wyniki podane w tabeli I oraz wyniki doświadczeń przeprowadzonych w Polsce w latach wcześniejszych (Marszewska-Ziemięcka 1937, Marszewska-Ziemięcka i współpracownicy 1937, Gołębiowska 1952b, Gołębiowska i Wróbel 1955), można przyjąć, że stosowanie szczepionek podwyższa plony uprawianych u nas roślin motylkowych średnio o 15-20%. Najlepiej reagowałyby na ten zabieg soja, lucerna i łubiny.

Poza ogólną zwyżką plonów uzyskujemy także dzięki szczepieniu: 1) zmniejszenie pobierania azotu z gleby podczas rozwoju roślin, 2) poprawę wartości plonów, 3) wzbogacenie gleby w azot i znaczne ilości substancji organicznej, co powoduje poprawę zasobności oraz struktury gleby. Odbija się to także korzystnie na plonach roślin następujących w płodozmianie po roślinach motylkowych.

Od 1956 r. zaczęto badanie w doświadczeniach polowych wartości nitraginy z Wałcza, porównując ją z działaniem szczepionki agarowej. Z porównania tych szczepionek wynikałoby, że nitragina działa na ogół równie dobrze jak szczepionka agarowa.

Polskich doświadczeń polowych mamy wciąż jeszcze za mało, aby można było powiedzieć, w których rejonach i jakie rośliny powinny być szczepione, gdzie natomiast zabieg ten nie jest konieczny. Na przykład

Tabela I

Wyniki doświadczeń polowych ze szczepieniem roślin motylkowych w latach 1948-1957

Results of field experiments during the years 1948—1957 on inoculation of leguminous plants

Rodzaj roślin Kind of plant	Rodzaj doświadczenia Kind of field experiments	Ogólna ilość doświadczeń Total number of experiments	Doświadczenia z dodatnimi wynikami % Quantity of exper. with positive results p. c.	Rodzaj plonu Kind of yield	Graniczne przyrosty plonów % Increase of yields-limits of p. c.	Średni przyrost plonu % Mean increase of yields p. c.
Lupinus Łubin	ścisłe	21	50	ziarno grain	0 — 52	10
		18	45	słoma straw	0 — 46	6
	łanowe	16	60	ziarno grain	0 — 220	27
		15	75	słoma straw	0 — 40	12
Ornithopus sativa Seradela	ścisłe	2	100	ziarno grain	7 — 17	7
		11	40	siano hay	0 — 20	6
	łanowe	5	80	ziarno grain	0 33	14
		11	90	siano hay	0 — 25	15
Pisum sativum Groch	ścisłe	4	75	ziarno grain	0 — 14	16
	łanowe	2	100	ziarno grain	5 — 11	8
		4	100	słoma straw	13 — 25	19
Medicago sativa Lucerna	ścisłe	9	80	siano hay	0 — 230	42
	łanowe	4	75	siano hay	0 — 29	13
Trifolium Koniczyna	ścisłe	9	55	siano hay	0 — 18	7
	łanowe	4	100	siano hay	13 — 45	25
Glycine hisp. Soja	ścisłe	4	100	ziarno grain	11 — 230	70
			100	słoma straw	14 — 16	15

szczepionki dla uprawianych u nas koniczyn mogą w niektórych wypadkach okazać się zbędne, podczas gdy na taką egzotyczną u nas roślinę jak soja działają zawsze dodatnio. Szczepionka może działać czasem w ten sposób, że nie daje wyraźnej zwyżki plonu siana lub ziarna, natomiast zwiększa zawartość białka w roślinach (Gołębiowska 1952 b).

Dużą pomocą przy stwierdzaniu skuteczności szczepienia roślin motylkowych były doświadczenia obserwacyjne i bezpośrednie odpowiedzi na naszą ankietę rolników stosujących ten zabieg. W wielu wypadkach otrzymali oni dość znaczne zwyżki plonów.

Na podstawie badań zagranicznych i naszych sądzimy, że łatwy i nie wymagający specjalnej robocizny zabieg szczepienia roślin motylkowych może oddać duże korzyści naszemu rolnictwu.

LITERATURA

Albrecht W., Mc Calla T. M., 1937: A new medium for rhizobia. *J. Bact.* **34:** 455.

Allen E. K., Allen O. N., 1950: Biochemical and symbiotic properties of rhizobia. *Bact. Rev.*, **14:** 273.

Allen E. K., Allen O. N., 1958: Biological aspects of symbiotic nitrogen fixation. W *Handbuch der Pflanzenphysiologie*, **8:** 47, Berlin.

Appelman M. D., Sears O. H., 1946: Studies on lyophiled cultures: Lyophile storage of cultures of *Rh. leguminosarum*. *J. Bact.*, **52:** 209.

Bieriozowa E. F., Dorosinskij L. M., Łopatina G. B., Mienkina R. A., Łazariew N. M., 1955: Primienienije baktierialnych udobrienij. Moskwa — Leningrad.

Bjälfve G., 1949: Inoculation trials of leguminous plants: from 1914 to 1948. Lucerne and clover trials. *Ann. Roy. Agricult. Col.* Sweden, **16:** 603.

Bonnier Ch., 1955: La conservation du *Rhizobium* en sols stériles (*Rhizobium* spécifique des *Trifolium*). *Bull. Inst. Agronom. et Sta. Rech., Gembloux*, **23:** 359.

Demolon A. M., 1951: Contribution à l'étude de la symbiose bactérienne chez les légumineuses. *Rev. gen. Botan.*, **58:** 110.

Fiodorow M. W., 1952: Biołogiczeskaja fiksacija azota atmosfiery. Moskwa.

Fred E. B., Baldwin J., Mc Coy E., 1932: Root nodule bacteria and leguminous plants. Madison.

Gisiger L., 1954: Untersuchungen über die Bedeutung der Impfung von Leguminosensaatgut. *Mitt. Geb. Lebensmittelunters. Hyg.*, **45:** 16. Wg *Zentr. Bakter.*, **108:** 725; 1955.

Gołębiowska J., 1952 a: Wpływ żywienia *Rh. trifolii* i *Rh. meliloti* różnymi związkami węgla na ich aktywność w symbiozie z rośliną. *Acta Microbiol. Polon.*, **1:** 328.

Gołębiowska J., 1952 b: Wyniki doświadczeń polowych ze szczepieniem roślin motylkowych. *Biul. Dośw. IUNG*, **4-5:** 24.

Gołębiowska J., Wróbel T., 1955: Wyniki doświadczeń ze szczepieniem roślin motylkowych. *Nowe Rolnictwo*, **4:** 69.

Helcer F. J., Jewtiejewa A., 1948: Łaboratornyj mietod opriedielenija aktiwnosti kłubienkowych baktierij. Puti powyszenija aktiwnosti kłubienkowych baktierij. Moskwa.

Heumann W., 1952 a: Über Wesen und Bedeutung der Bakteroide in den Wurzelknöllchen der Erbse. *Naturwissenschaften*, **39:** 66.

Heumann W., 1952 b: Über das Abhängigkeitverhältnis zwischen Hämoglobin-Stärke-, Bakteroidverkommen und Stickstoffbindung in Wurzelknollchen der Erbse. *Naturwissenschaften*, **39**: 66.

Hlavačkova E., Vintikova H., Kozova J., Apltauer J., 1956: Research on inoculants in Czechoslovakia. *Za Soc. Siel. Choz. Nauku, Seria A*, **5**: 287.

Hofer A. W., Little H. B., 1955: Inoculant tests for 1955: *Agr. Exp. Sta. Geneva, N. Y., Bull.* nr 772.

Hofer A. W., Kirk E. W., 1956: Inoculant tests for 1956: *Agr. Exp. Sta. Geneva, N. Y., Bull.* nr 778.

Jakowlewa Z. M., 1957: Sostojanije kłubienkowych baktierij w usłowijach simbioza i fiksacji molekularnogo azota. *Izw. Akad. Nauk SSSR (Biol.)*, (5): 241.

Jordan D. C., Garard E. H., 1951: Studies on the legume root-nodule bacteria of effective and ineffective strains. *Canad. J. Botan.*, **29**: 360.

Kłosowska T., 1952: Rozwój symbiozy *Rh. leguminosarum* z grochem (praca magisterska, nieopublikowana). UMCS Lublin.

Kobus J., 1952: Niektóre cechy morfologiczne i fizjologiczne bakterii symbiotycznych roślin motylkowych. *Acta Microbiol. Polon.*, **2**: 137.

Krasilnikow N. A., Koreniako A. L., 1944: Wlijanije poczwiennoj mikroflory na wirulentnost kłubienkowych baktierij. *Mikrobiologija*, **13**: 39.

Manil P., Bonnier Ch., 1955: Note concernant l'inoculation des semences de *Trifolium pratense* (Trefle violet) en Belgique. *Bull. Inst. Agronom. et des Sta. Rech. de Gembloux*, **23**: 456.

Marszewska-Ziemięcka J., 1937: Szczepienie roślin motylkowych. I. Szczepienie lucerny. *Pam. Puławski*, **17**: 133.

Marszewska-Ziemięcka J., Nowotnówna A., Klukowska W., 1937: Szczepienie roślin motylkowych. II Szczepienie soi. *Pam. Puławski*, **17**: 235

Nutman P. S., 1946: Variation within strains of clover nodule bacteria in the size of nodule produced and in the effectivity of symbiosis. *J. Bact.*, **51**: 411.

Rabotnowa I. Ł., 1941: Okislitielno-wostanowitielnyj potencjał sriedy w swiazi s uswojenijem molekularnogo azota. *Mikrobiologija*, **10**: 526.

Rudakow K., 1951: Nitragin. *Mikrobiologija*, **20**: 343.

Schmidt O. C., 1947: Über einige einfache Nährboden zur Kultur von *Bacterium radicicola*. *Zeitschr. Pflanzenernährung Düng.*, **38**: 165.

van Schreven D. A., Harmsen G. W., Lindenbergh D. J., Otzen D., 1953: Experiments on the cultivation of *Rhizobium* in liquid media for use on the Zuiderzee polders. *Leeuwenhoek Nederl. Tijdschr.*, **19**: 300.

van Schreven D. A., Otzen D., Lindenbergh D. J., 1954: On the production of legume inoculants in a mixture of peat and soil. *Leeuwenhoek Nederl. Tijdschr.*, **20**: 33.

Śnieszko S., 1934: Doświadczenia ze szczepieniem motylkowych. *Gaz. Rolnicza*, **13**: 320.

Virtanen A. I., Jorma J., Linkola H., Linnasalmi A., 1947: On the relation between nitrogen fixation and leghemoglobin content of leguminous root nodules. I. *Acta Chim. Scand.*, **1**: 90.

Virtanen A. I., Erkoma J., Linkola H., 1947: On the relation between nitrogen fixation and leghemoglobin content of leguminous root nodules. II. *Acta Chim. Scand.*, **1**: 861.

Wieringa K. T., Bakhuis J. A., 1957: Chromatography as a means of selecting effective strains of *Rhizobium*. *Plant a. Soil*, **8**: 254.

Wróbel T., 1956: Search of a rapid method for determining the activity of strains of the root nodule bacteria. *Acta Microbiol. Polon.*, **5**: 117.

Wróbel T., Gołębiowska J., 1956: Inokulacja bobowych rastenij kłubienkowymi baktieriami na razlicznych poczwach (komunikat). *Acta Microbiol. Polon.*, 5: 122.

T. Wróbel

PRODUCTION OF CULTURES OF *RHIZOBIUM* FOR LEGUMINOUS PLANTS AND THE RESULTS OF THEIR APPLICATION IN FIELD EXPERIMENTS

Summary

The author gives a review of some recent investigations connected with the production of cultures of *Rhizobium* for inoculation of leguminous plants. The report of author's own studies on the influence of different carbon sources on the development of *Rhizobium* and on the effect of lyophilization on the activity of cultures is included.

In table I the Polish results of inoculation of different leguminous plants are given for the years 1948-1957. Many field experiments have also been carried out in Poland before the war. Soy-beans, lucerne and lupine have been specially well influenced by this treatment. Mean results for all kinds of plants investigated have been equal to a 15-20 p. c. increase of their yields.

DYSKUSJA

W. Boguszewski

Konieczne jest kontynuowanie i rozszerzenie doświadczeń nad szczepieniem roślin motylkowych odpowiednimi bakteriami. Poza dostarczeniem danych o skuteczności szczepienia, doświadczenia te spełniają rolę propagandową. W zestawieniu wyników tych doświadczeń konieczne jest podawanie nie tylko przeciętnego efektu, lecz również procentu doświadczeń dających wynik pozytywny.

Jak postępuje rozwój produkcji szczepionek w Wałczu i jaki jest stosunek ich produkcji do popytu?

J. Zbikowski

Na podstawie obserwacji prowadzonych od wielu lat w doświadczalnictwie rolniczym należy ocenić dodatnio szczepienie roślin motylkowych bakteriami. Rozpoczęte w ostatnich latach doświadczenia polowe ze szczepionkami azotobaktera są również zachęcające i wskazują, że tą drogą można będzie powiększać plony nie tylko roślin motylkowych, ale i innych upraw.

B. Smyk

Przy uprawie roślin motylkowych bardzo ważny problem stanowią wirusy. W Szwajcarii istnieją stacje badawcze, poświęcone wyłącznie temu zagadnieniu. Duży nacisk kładzie się tam również na podniesienie aktywności szczepionek *Rhizobium* przez stosowanie substancji wzrostowych, jak tiamina, mezoinozytol, kwas giberylinowy i inne. Badacze tamtejsi twierdzą, że substancje te powodują zwolnienie metabolizmu węglowodanowego w początkowym okresie symbiozy, co ma następnie dodatnio wpływać na metabolizm azotowy.

Odpowiedź autora:

Obecnie produkuje się w Polsce szczepionki w ilości wystarczającej na 60-70 000 ha.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1959, 8 : 333—337

K. Bereśniewicz

PRÓBY PRZYSPIESZANIA ROZWOJU POWOLI ROSNĄCYCH SZCZEPÓW *RHIZOBIUM*

Z Zakładu Mikrobiologii Rolnej Wyższej Szkoły Rolniczej w Lublinie

Jak wiadomo, w obrębie rodzaju *Rhizobium* wyróżnia się dwie grupy odmienne pod względem cech hodowlanych: bakterie szybko rosnące, dające na pożywkach agarowych obfity, przeźroczysty wzrost i wytwarzające dużo śluzu oraz bakterie powoli rosnące charakteryzujące się słabszym wzrostem i mniejszą ilością śluzu.

Przy poszukiwaniu podłoży najbardziej przydatnych do szybkiego rozmnożenia i zachowania żywotności *Rhizobium* pomocne są badania nad właściwościami biochemicznymi i hodowlanymi tych bakterii. Dużą uwagę w badaniach nad środowiskiem odżywczym zwraca się na charakter substancji będących źródłem węgla i azotu dla *Rhizobium,* ponieważ mogą one decydować o nasileniu wiązania azotu atmosferycznego (Nowotny-Mieczyńska i Gołębiowska 1952). Substancje dostarczające węgla i azotu są, zależnie od gatunku *Rhizobium,* w różnym stopniu przyswajane i różnie oddziaływają na metabolizm tych bakterii (Fred, Baldwin i Mc Coy 1932). Wilson i Burris (1947) zaobserwowali, że sole kwasów organicznych powodują intensywniejszy rozwój i oddychanie bakterii z grupy powoli rosnących, natomiast grupa bakterii szybko rosnących łatwiej przyswaja węglowodany. Wcześniejsze badania Nielsena i Johansena (1942) donoszą o stymulującym oddziaływaniu kwasu cytrynowego na wzrost powoli rosnących gatunków *Rhizobium japonicum* i *Rh. lupini.* Badania przeprowadzone w Dziale Mikrobiologii IUNG w Puławach również wykazały, że stopień rozwoju poszczególnych gatunków *Rhizobium* zależy od dostarczonego im w pożywce źródła węgla.

Substancje azotowe niezbędne przy hodowli *Rhizobium* na sztucznych podłożach mogą być także różnie wykorzystywane przez różne gatunki *Rhizobium* (Fred, Baldwin i Mc Coy 1932). Burris i Wilson (1952) stwierdzają, że związki białkowe, takie jak kazeina lub żelatyna, są bardzo słabo asymilowane przez *Rhizobium.* Dobrze przyswajalne są,

hemoglobiny silną stymulację procesów oddechowych *Rhizobium* wywołuje obecność w podłożu takich aminokwasów jak: glicyna, alanina, kwas asparaginowy i kwas glutaminowy. Ponadto badacze ci zaobserwowali, że mieszanka aminokwasów wchodzących w skład hydrolizatu kazeiny silniej pobudzała rozwój *Rhizobium* niż pojedyncze aminokwasy.

Thorne i Walker (1936). West i Wilson (1939, 1940) oraz Jordan (1952), zajmując się zapotrzebowaniem *Rhizobium* na substancje wzrostowe stwierdzili, że zależy ono od jego gatunku.

Wielu badaczy zwracało również uwagę na warunki tlenowe w środowisku odżywczym *Rhizobium* (Rabotnowa 1936, Nielsen 1940, Bazarewa i Łopatina 1953, Zaremba 1956). Natlenianie podłoża przyczynia się na ogół do szybszego rozmnażania się komórek, szczególnie w warunkach hodowli płynnej. Rabotnowa (1936) badając zmiany wartości potencjału oksydo-redukcyjnego pod wpływem różnych gatunków *Rhizobium*, stwierdziła, że grupa bakterii powoli rosnących znacznie mniej obniża wartość tego potencjału, niż grupa bakterii szybko rosnących. Różnice w energii fermentacyjnej między gatunkami *Rhizobium* powoli rosnących i szybko rosnących obserwowali także Burris i Wilson (1952).

Pomimo, że wykonano już wiele prac nad warunkami rozwoju *Rhizobium* celowe jest poszukiwanie nadal takich czynników, które stymulowałyby rozwój powoli rosnącej grupy tych bakterii.

BADANIA WŁASNE

Celem niniejszej pracy było poszukiwanie takiej metody hodowli płynnej powoli rosnących szczepów *Rhizobium*, z pomocą której można by szybko je rozmnożyć. Opracowanie takiego sposobu hodowli jest ważne dla produkcji szczepionek dla roślin motylkowych.

Nawietrzanie hodowli

Badania nasze prowadzono na szczepach powoli rosnących i należących do gatunku *Rh. lupini* i *Rh. japonicum*, które otrzymano z Działu Mikrobiologii IUNG w Puławach. W doświadczeniu tym zastosowano nawietrzanie typu trzęsawkowego. Długość przesuwów ustalono na 7 cm a ich częstotliwość na 90/min. Nie stwierdzono istotnego wpływu stosowanego przez nas nawietrzania na rozwój powoli rosnących szczepów hodowanych w słupie pożywki o wysokości około 6 cm.

nek *Rhizobium*	Nr i symbol szczepu Number of strain		pożywki Kind of medium	Początkowa Initial	Czas hodowli w godzinach Time of incubation in hours			
					24	48	72	96
Rh. lupini	Szczepy dla łubinu strains for lupine	*Cz₂*	1	7	13	32	83	340
			2		16	56	143	911
			3		18	49	139	885
			4		9	26	94	637
			5		14	36	103	721
			6		15	48	110	905
			7		13	28	99	646
		271	1	9	20	62	152	518
			2		23	100	385	1250
			3		23	101	373	1230
			4		17	68	144	695
			5		21	84	280	953
			6		23	96	190	860
			7		20	56	211	734
		359 a	1	8	17	50	169	411
			2		21	147	665	1335
			3		23	178	654	1300
			4		21	152	596	1111
			5		23	131	481	1261
			6		21	173	618	1190
			7		17	106	637	976
	szczepy dla seradeli strains for serradilla	*5*	1	10	19	50	114	478
			2		19	67	123	505
			3		35	135	370	1180
			4		29	115	290	886
			5		29	134	316	958
			6		35	121	351	1051
			7		22	75	183	695
		S	1	10	26	58	185	369
			2		27	45	197	426
			3		31	110	335	1011
			4		30	85	263	979
			5		28	114	307	1002
			6		30	112	345	921
			7		25	38	177	385
Rh. japonicum	szczepy dla soi strains for soybeans	*94p*	1	7	27	61	295	983
			2		36	117	430	1556
			3		36	228	486	1513
			4		21	75	239	963
			5		33	137	312	1202
			6		36	217	405	921
			7		27	250	368	385
		101C	1	9	33	106	381	905
			2		34	210	364	2043
			3		37	271	657	1984
			4		30	195	372	911
			5		36	273	586	1304
			6		34	250	515	1285
			7		27	77	494	1051

Objaśnienia:
Remarks:

pożywka Thorntona — Thorntonis medium

1. 100 ml { wody drożdżowej / yeast extract
2. 10 ml { hydrolizatu kazeiny / caseine hydrolizate
3. 31,03 mg { mieszanki aminokwasów / mixture of aminoacids
4. + { mieszanka aminokwasów, bez glicyny / mixture of aminoacids without glycine
5. + { mieszanka aminokwasów bez kwasu asparaginowego / mixture of aminoacids without aspartic acid
6. + { mieszanka aminokwasów bez l-alaniny / mixture of aminoacids without l-alanine
7. + { mieszanka aminokwasów bez cysteiny / mixture of aminoacids without cysteine

Wpływ składu pożywki

Poszukiwania czynników stymulujących wzrost powoli rosnących szczepów bakterii brodawkowych dotyczyły składu pożywki hodowlanej. Szczepy macierzyste przechowywano przez cały okres badań na pożywce Thorntona z wodą drożdżową. Probując zmodyfikować tę pożywkę zwrócono uwagę na charakter substancji stanowiących źródła węgla i azotu. Przeprowadzono szereg prób hodowlanych na pożywce Thorntona przy użyciu glikozy lub mannitolu jako źródeł węgla. Stwierdzono przy tym, że większość szczepów badanych mnożyła się szybciej na mannitolu. Uzyskano półtora do 2 razy większy przyrost komórek w pożywce z mannitolem niż w pożywce z glikozą po upływie tego samego czasu hodowli.

Wpływ natury połączeń azotowych

Jako źródła azotu w pożywce stosowano: 1) wodę drożdżową, 2) kwaśny hydrolizat kazeiny, 3) mieszankę aminokwasów, wchodzących w skład hydrolizatu kazeiny. Już w czasie wykonywania pierwszych prób okazało się, że hydrolizat kazeiny zawiera składniki stymulujące wzrost *Rhizobium*. Z wyników zamieszczonych w tabeli I widać, że szczepy *Rh. lupini* dla łubinu i *Rh japonicum* dla soi mnożyły się 3 razy silniej w pożywce z dodatkiem hydrolizatu kazeiny niż w podłożu z wodą drożdżową. Natomiast wzrost szczepów *Rh. lupini* dla seradeli był słabo pobudzany przez hydrolizat kazeiny w porównaniu z działaniem wody drożdżowej. W celu zbadania wykorzystania azotu aminowego z hydrolizatu kazeiny przez *Rhizobium* dokonywano oznaczenia ilości azotu aminowego pozostającego w pożywkach po hodowli powoli rosnących szczepów lub w okresie najsilniejszego mnożenia się komórek. Ubytek azotu aminowego z podłoża wahał się w granicach 0,1-0,05 mg w 1 ml co stanowiło 0,3-0,16% ogólnej ilości azotu aminowego w pożywce, w zależności od szczepu *Rhizobium*. Dla wyjaśnienia przyczyny stymulującego oddziaływania hydrolizatu kazeiny na wzrost powoli rosnących szczepów *Rhizobium* następne serie doświadczeń prowadzone były na pożywce zawierającej mieszankę aminokwasów, wchodzących w skład hydrolizatu kazeiny. Hodowla na pożywce z aminokwasami okazała się korzystna dla szczepów *Rh. lupini* dla seradeli (tabela I). Szczepy te nie były stymulowane przez dodatek hydrolizatu kazeiny do pożywki, lecz na aminokwasach dawały w tym samym czasie hodowli 2,5 razy wyższy plon komórek niż w pożywce z wodą drożdżową. Drogą eliminowania poszczególnych aminokwasów z pożywki stwierdzono, że wszystkie powoli rosnące szczepy *Rhizobium* reagowały najsilniej na brak w pożywce glicyny, cysteiny, alaniny i kwasu asparaginowego. Zauważono również, że różne szczepy reagowały swoiście na brak poszczególnych aminokwasów w podłożu. Tak np. *Rh. lupini* (szczep

nr 271) reagował najsilniej na brak glicyny i cysteiny, mnożąc się w tych warunkach 2 razy słabiej niż w pożywce z pełnym kompletem aminokwasów. Szczepy *Rh. lupini* dla seradeli najsilniej reagowały na wykluczenie z pożywki aminokwasowej cysteiny, co objawiało się 2 razy słabszym mnożeniem się komórek niż w pożywce pełnej. Brak glicyny, kwasu asparaginowego lub alaniny w mniejszym stopniu decydował o intensywności mnożenia się komórek szczepów *Rh. lupini* dla seradeli. Na rozmnażanie się *Rh. japonicum* najbardziej hamująco wpływały brak glicyny lub cysteiny. Przy nieobecności kwasu asparaginowego lub alaniny różnice między tymi kombinacjami hodowlanymi i kombinacją z wszystkimi aminokwasami były mniej wyraźne. W czasie badań nad wpływem aminokwasów na rozwój powoli rosnących *Rhizobium* zaobserwowano, że brak glikokolu lub cysteiny wpływał wyraźnie hamująco na mnożenie się tej bakterii już w ciągu 24 godzin hodowli, podczas gdy brak kwasu asparaginowego i alaniny ujawniał się w późniejszym okresie hodowli..

W celu zbadania, czy stymulujący wpływ wyżej wymienionych czterech aminokwasów jest powiązany z kompleksowym oddziaływaniem pozostałych aminokwasów wchodzących w skład ich mieszanki lub hydrolizatu kazeiny, przeprowadza się dalsze badania nad oddziaływaniem poszczególnych aminokwasów na rozwój powoli rosnących szczepów.

Być może, że dodawanie do zwykle stosowanej pożywki tych aminokwasów, które w naszych badaniach okazały się najkorzystniejsze dla tempa rozwoju *Rhizobium*, będzie tym czynnikiem, który w przyszłości będzie można z powodzeniem wprowadzić do techniki wyrobu szczepionek.

LITERATURA

Bazarewa N. N., Łopatina G. W., 1953: Mietod uskoriennowo wyraszczywanija klubienkowych baktierii. *Trudy Wsiesoj. Naucz. Issl. Inst. Siel. choz. Mikrobiol.*, **13: 96.**

Burris R. H., Wilson P. W., 1952: Effect of haemoglobin and other nitrogenous compounds on the respiration of *Rhizobia. Biochem. J.* **51:** 90.

Fred E. B., Baldwin I. L., Mc Coy I. E., 1932: Root nodule bacteria and leguminous plants. Univ. of Wisconsin, Madison.

Jordan D. C., 1952: Studies on the legume root nodule bacteria, *Canad. J. Botan.*, **30: 393.**

Nielsen N., 1940: Untersuchungen über biologische Stickstoffbindung *C. R. Trav. Lab. Carlsberg., Sér. Physiol.*, **23: 116.**

Nielsen N., Johansen G., 1941: Vergleichende Untersuchungen über das Wachstum verschiedener *Bacterium radicicola* Stämme auf verschiedenen Stickstoffquellen. *C. R. Trav. Lab. Carlsberg., Sér. Physiol.*, **23: 163.**

Nielsen N., Johansen G., 1942: Untersuchungen über biologische Stickstoffbindung. *C. R. Trav. Lab. Carlsberg., Sér. Physiol.*, **23: 399.**

Nowotny-Mieczyńska A., Gołębiowska J., 1952: Problemy symbiotycznego wiązania wolnego azotu. PWRiL, Warszawa.

Robotnowa I. L., 1936: Okislitielno-wostanowitielnyj riežim azotuswajatielej grupy *Rhizobium*. *Mikrobiologija*, **5**: 217.

Thorne D. W., Walker R. H., 1936: Physiological studies on *Rhizobium*. *Soil Sci.*, **42**: 301.

West P., Wilson P. W., 1939: Growth factor requirement of the root nodule bacteria. *J. Bact.*, **37**: 161.

West P., Wilson P. W., 1940: Biotin as a growth stimulant for the root nodule bacteria. *Enzymologia*, **8**: 152.

Wilson P. W., Burris R. H., 1947: The mechanizm of biological nitrogen fixation. *Bact. Rev.*, **11**: 41.

Zaremba W. P., 1956: Ob usłowijach opriedielajuszczich razmnożenije klubienkowych baktierii lupina pri proizwodstwie nitragina. *Mikrobiologija*, **2**: 34.

K. Bereśniewicz

STUDIES ON THE ACCELERATION OF THE DEVELOPMENT OF THE SLOW GROWING STRAINS OF *RHIZOBIUM*

Summary

The aim of this work was to investigate the factors stimulating the development of slow growing strains of root-nodule bacteria in liquid medium. The investigations were carried out with strains of *Rh. lupini* and *Rh. japonicum*. The first part of this work was concerned with the influence of the aeration of liquid media on the rate of multiplication of the cells of *Rhizobium*.

The second part was dealing with the influence of various nitrogen and carbon compounds on the development of these microbes. As carbon sources glucose and mannitol were used. Nitrogen compounds applied have been: yeast extract, hydrolyzate of caseine and a mixture of aminoacids (glycine, alanine, valine, leucine, proline, phenyloalanine, aspartic acid, glutamic acid, tyrozine and cysteine). The results of investigation (see table I) have shown a favourable influence of the caseine hydrolyzate and of the mixture of aminoacids used, on the multiplication of *Rhizobium* strains for lupine and soybean. Whereas strains for serradilla were stimulated only by the above mixture of aminoacids.

Among all the aminoacids which were present in the hydrolyzate, the most important for the development of slow growing strains of *Rhizobium* were: glycine, l-alanine, aspartic acid and cysteine.

DYSKUSJA

J. Ziemięcka

W jaki sposób zamierza autorka badać wpływ poszczególnych aminokwasów na rozwój *Rhizobium*?

A. Mieczyńska

Czy autorka stosowała w swoich badaniach kwas glutaminowy i glutaminę?

Odpowiedź autorki:

Wpływ poszczególnych aminokwasów na rozwój *Rhizobium* ma być badany przez ich kolejne wyłączanie ze składu pożywki. Kwas glutaminowy okazał się istotnym składnikiem pokarmowym dla *Rh. lupini*. Istotnym składnikiem okazały się również cysteina i alanina, przy czym działanie tej ostatniej można by tłumaczyć tym, że jest ona prekursorem kwasu pantotenowego.

WNIOSKI Z KONFERENCJI

Zebrani w dniu 16-17 grudnia 1958 r. na Konferencji pt. „Symbiotyczne wiązanie wolnego azotu przez *Rhizobium*" stwierdzają potrzebę rozszerzenia badań nad biologią i chemizmem symbiotycznego wiązania azotu ze względu na wielkie znaczenie tego problemu dla rozwoju nauk biologicznych i rolniczych oraz dla praktyki rolniczej.

Za najpilniejsze zadania uważają zebrani:

1. Oparte na genetyce i na cytochemii badania nad zdolnością wiązania wolnego azotu przez różne szczepy *Rhizobium* oraz próby otrzymywania aktywnych szczepów przy użyciu metod genetycznych
2. Bliższe zbadanie, kiedy i w jakich warunkach *Rhizobium* nabiera zdolności wiązania wolnego azotu wewnątrz rośliny i kiedy ją traci w połączeniu z badaniem protoplastów i z innymi metodami badań
3. Badania genetyczne i biochemiczne nad uzdolnieniami symbiotycznymi roślin
4. Wyjaśnienie pokrewieństw serologicznych między różnymi grupami *Rhizobium* przez rozszerzone badania budowy antygenowej
5. Wyjaśnienie wpływu bakteriofagów na powstawanie w glebie aktywnych lub nieaktywnych mutantów *Rhizobium* należącego do grupy łubinów i do innych mało zbadanych grup oraz użycie fagów do typowania szczepów *Rhizobium*
6. Potrzeba znalezienia szybkiej metody pozwalającej na oznaczanie wartości szczepionek
7. Ulepszanie wyrobu szczepionek oraz propagowanie i popularyzacja zabiegu szczepienia roślin motylkowych

Wnioski te zostały jednomyślnie przyjęte.

SKOROWIDZ AUTORÓW DO VOL. VIII

Bareśniewicz K. — Próby przyspieszenia rozwoju powoli rosnących szczepów *Rhizobium* 333
Bożko L. — Metodyka analiz mikrobiologicznych ścieków i wód powierzchniowych zanieczyszczonych ściekami 33
Buczowska Z. — Bakterie *Salmonella* w ściekach i zanieczyszczonej wodzie 27
Buśko J. — Uzdolnienie symbiotyczne i niektóre cechy fizjologiczne bakterii brodawkowych współżyjących z komonicą i przelotem. Doniesienie 303
Cabejszek I. — patrz Just.
Cienciała M. — patrz Smyk S.
Drozdowicz A. — W sprawie oporności roślin na zakażenie nieswoistym szczepem *Rhizobium*. Doniesienie 295
Drożańska D. — Budowa antygenowa różnych szczepów *Rhizobium* . 249
Fiuczek M. — Wiązanie azotu atmosferycznego w czystych kulturach *Streptomyces alni* 283
Gańczarczyk J. — Badania nad kinetyką samooczyszczania się rzeki zanieczyszczonej ściekami z fabryki celulozy siarczynowej 77
Gańczarczyk J. — Próby ustalenia właściwej metodyki badań laboratoryjnych nad oczyszczeniem ścieków przemysłowych metodą osadu czynnego 151
Gańczarczyk J. — Badania nad beztlenowym rozkładem kwasów lignino-sulfonowych 157
Głowacki J. — patrz Thom R.
Gołębiowska J. — Niektóre zagadnienia współżycia roślin motylkowych z bakteriami. Referat przeglądowy 259
Gołębiowska J. i Sypniewska U. — Wpływ rośliny na rozwój jej współżycia z *Rhizobium*. I. Rozwój tkanki bakteroidalnej w naroślach korzeniowych różnych odmian łubinu. Doniesienie 299
Just J., Cabejszek I. i Ziemińska S. — Stan badań naukowych nad mikrobiologią ścieków i wód powierzchniowych zanieczyszczonych ściekami w Polsce 7
Kajetanowicz Z. — patrz Smyk B.
Karczewska H. — Oczyszczanie ługów z wywarów posiarczynowych świerkowych na drodze zdrożdżowania 115
Kintzel A. — Zastosowanie osadu czynnego do oczyszczania ścieków z drożdżowni i krochmalni 145
Kluczycki K. i Petrycka H. — Metoda ultrafiltrów membranowych w zastosowaniu do badań *E. coli* i grup morfologicznych bakterii w ściekach 41

Kluczycki K. — Podstawy biologicznego oczyszczania ścieków. Przegląd 135
Kluczycki K. — Wykorzystanie swoistych biocenoz z fenolowych ścieków przemysłowych do ich biologicznego oczyszczania Cz. I. 165
Kołaczkowski S., Kowalczyk J. i Żukowski Z. — Chlorowanie ścieków w sanatoriach przeciwgruźliczych. I. Zależność przeżywalności prątków od stężenia chloru i czasu jego działania 181
Kowalczyk J. — patrz Kołaczkowski S.
Kowalski M. i Staniewski R. — Wstępne badania nad wrażliwością różnych szczepów *Rhizobium* na fagi 253
Kulik-Kuziemska I. — Użyteczność metody Pantle'a przy interpretacji wyników badań hydrobiologicznych 49
Kulik-Kuziemska I. — Charakterystyka biologiczna wód basenu portowego w Gdańsku w rejonie zrzutu ścieków miejskich 57
Lorkiewicz Z. — Z zagadnień zmienności i genetyki *Rhizobium*. Referat przeglądowy 225
Marszewska-Ziemięcka J. — Z zagadnień cytologii i fizjologii *Rhizobium*. Referat przeglądowy 209
Nadziakiewicz H. i Warzywoda J. — Usuwanie siarczanów z wód ściekowych przemysłu sztucznych włókien wiskozowych na drodze biologicznej redukcji 169
Niewiarowska J. — Symbioza u rokitnika 289
Nowotny-Mieczyńska A. — Niektóre problemy mechanizmu wiązania wolnego azotu. Referat przeglądowy 271
Nowotny-Mieczyńska A. i Zinkiewicz J. — Wpływ żywienia rośliny na aktywność *Rhizobium trifolii* w symbiozie z koniczyną. Doniesienie 309
Paluch J. Charakterystyka mikrobiologiczna wód dorzecza południowej Wisły 91
Paluch J. i Zdybiewska M. — Charakterystyka niektórych bakterii wyizolowanych z wody filtrów pospiesznych w Kozłowej Górze . . . 67
Petrycka H. — patrz Kluczycki K.
Różycki E. — patrz Smyk B.
Skalski K. — Czynniki wpływające na procesy biologiczne istotne dla oczyszczania ścieków cukrowniczych w stawach biologicznie czynnych 185
Smyk B. i Cienciała M. — Wpływ ścieków przemysłu chemicznego (azotowego) i energetycznego (elektrociepłownia) na stan mikrobiologiczny wód rzek górskich 125
Smyk B. i Różycki E. — Charakterystyka mikrobiologiczna, hydrobiologiczna i chemiczna wód rzek górskich przeznaczonych dla celów rolniczych 129
Smyk B., Kajetanowicz Z. i Urbaniak A. — Próby określenia zdolności samooczyszczania rzek w oparciu o metodę statystyczną . . 131
Staniewski R. — patrz Kowalski M. 253
Starmach K. — Badania hydrobiologiczne wód powierzchniowych i ich związek z mikrobiologią 21
Srzednicka W. — patrz Thom R.
Sypniewska U. — Wpływ rośliny na rozwój jej symbiozy z *Rhizobium*. II. Rozwój narośli korzeniowych u różnych odmian i rodów seradeli. Doniesienie 301

Sypniewska U. — patrz Gołębiowski J.
Thom R., Głowacki J. i Srzednicka W. — Oczyszczanie ścieków mleczarskich metodą osadu czynnego 175
Turoboyski L. — Zastosowanie systemu saprobów do oceny zanieczyszczenia organicznego rzek Serafy i Drwiny, zasolonych przez ścieki z kopalni soli w Wieliczce 47
Urbaniak A. — patrz Smyk B.
Uziakowa Z. — Wpływ różnych form azotu na rozwój i symbiozę soi. Doniesienie 351
Warzywoda J. — patrz Nadziakiewicz H.
Wróbel T. — Wyrób szczepionek i wyniki szczepienia nimi roślin motylkowych. Referat przeglądowy 321
Zdybiewska M. — Niektóre biochemiczne przemiany zaobserwowane w ściekach piwowarskich 111
Zdybiewska M. — patrz Paluch J.
Ziemińska S. — patrz Just J.
Zinkiewicz J. — patrz Nowotny-Mieczyńska A.
Żukowski Z. — patrz Kołaczkowski S.
Żelazna I. — Protoplasty i penicylinaza u *Rhizobium* 235

SKOROWIDZ RZECZOWY DO VOL. VIII

Antygenowa budowa szczepów *Rhizobium* 249
Azot atmosferyczny — wiązanie w czystych kulturach *Streptomyces alni* . 283
Azot cząsteczkowy — patrz „Symbioza", *Rhizobium*
Azot wolny — mechanizm wiązania 271
Bakterie w ściekach — badanie metodą ultrafiltrów membranowych . . . 41
Bakterie wyizolowane z wody z filtrów pospiesznych 67
Bakterie współżyjące z roślinami motylkowymi — warunki aktywnej symbiozy 259
Bakterie **brodawkowe** współżyjące z komonicą i przelotem 303
Bakteriofagi — patrz Fagi
Bakteroidalna tkanka — patrz tkanka bakteroidalna
Biochemiczne przemiany — w ściekach piwowarskich 111
Biologiczna charakterystyka wód basenu portowego 57
Biologiczna **redukcja** w usuwaniu siarczanów z ścieków przemysłu włókien sztucznych 169
Biologiczne oczyszczanie ścieków przemysłowych fenolowych 165
Biologiczne **podstawy** oczyszczania ścieków 135
Biologiczne **procesy** oczyszczania ścieków cukrowniczych 185
Celulozy siarczynowej fabryka, ścieki 77
Chlor, wpływ stężenia i czasu działania na przeżywalność prątków gruźlicy w ściekach 181
Chlorowanie ścieków sanatoriów przeciwgruźliczych 181
Cukrownie, ścieki — oczyszczanie biologiczne 185
Cytologia *Rhizobium* 209
Drożdżownie i **krochmalnie**, zastosowanie osadu czynnego do oczyszczania ścieków 145
Escherichia coli — w ściekach, badanie przy pomocy ultrafiltrów 41

Fagi — badania nad wrażliwością szczepów *Rhizobium* 253
Fenolowe ścieki przemysłowe, oczyszczanie 165
Filtry pospieszne, charakterystyka 67
Fizjologia *Rhizobium* 209
Fizjologiczne cechy bakterii brodawkowych 303
Genetyka *Rhizobium* 225
Hydrobiologiczne badanie wód powierzchniowych, związek z mikrobiologią . 21
Hydrobiologiczne badanie, użyteczność metody P a n t l e'a 49
Hydrobiologiczne badanie wód rzek górskich 125
Komonica, współżycie z bakteriami brodawkowymi 303
Koniczyna, wpływ żywienia rośliny na aktywność *Rhizobium* 309
Krochmalnie, zastosowanie osadu czynnego do oczyszczania ścieków . . 145
Ligninosulfonowe kwasy — rozkład beztlenowy 157
Łubin, rozwój tkanki bakteroidalnej w naroślach korzeniowych 299
Ługi z wywarów posiarczynowych, oczyszczanie 115
Mikrobiologia ścieków i wód powierzchniowych — stan badań w Polsce . . 7
Mikrobiologia ścieków i wód powierzchniowych — metoda analiz 33
Mikrobiologia wód powierzchniowych — związek z hydrobiologią . . . 21
Mikrobiologia wód południowej Wisły 91
Mikrobiologiczny stan wód rzek, wpływ ścieków przemysłowych 125
Mikrobiologiczny stan wód rzek górskich, przeznaczonych dla celów rolniczych 129
Motylkowe rośliny — patrz rośliny motylkowe
Narośle korzeniowe u odmian łubinu 299
Narośle korzeniowe u odmian i rodów seradeli 301
Oczyszczanie ługów z wywarów posiarczynowych świerkowych 115
Oczyszczanie **ścieków** z drożdżowni i krochmalni — patrz biologiczne oczyszczanie ścieków
Oczyszczanie ścieków — **podstawy biologiczne** 135
Oczyszczanie ścieków **mleczarskich** metodą osadu czynnego 175
Oczyszczanie ścieków **cukrowniczych** w stawach biologicznie czynnych . . 185
Osad czynny — zastosowanie do oczyszczania ścieków z drożdżowni i krochmalni 145
Osad czynny w oczyszczaniu ścieków, metodyka badań laboratoryjnych . . 151
Osad czynny, w oczyszczaniu ścieków mleczarskich 175
P a n t l e'a **metoda** — użyteczność w badaniach hydrobiologicznych . . . 49
Penicylinaza u *Rhizobium* 235
Piwowarskie ścieki — patrz ścieki piwowarskie
Prątki gruźlicy, przeżywalność w ściekach w zależności od chlorowania . . 181
Protoplasty u *Rhizobium* 235
Przelot, współżycie z bakteriami brodawkowymi 303
Rhizobium cytologia i fizjologia 209
Rhizobium genetyka 225
Rhizobium, protoplasty i penicylinaza 235
Rhizobium, budowa antygenowa 249
Rhizobium, wstępne badania nad wrażliwością na fagi 253
Rhizobium, zakażenie przez nieswoisty szczep 295
Rhizobium — wpływ rośliny na rozwój symbiozy z *Rhizobium* . . . 299
Rhizobium — wpływ rośliny na rozwój symbiozy u seradeli 301
Rhizobium — próby przyspieszenia rozwoju wolno rosnących szczepów . . 321
Rhizobium trifolii — aktywność w zależności od żywienia roślin 309

Rhizobium — patrz „bakterie symbiotyczne roślin motylkowych"
Rokitnik — symbioza z bakteriami 289
Rośliny motylkowe, oporność na zakażenia nieswoistym szczepem *Rhizobium* 295
Rośliny motylkowe, szczepionki 321
Rośliny motylkowe, wpływ na rozwój symbiozy u łubinu 299
Rośliny motylkowe, wpływ na rozwój symbiozy u seradeli 301
Rośliny motylkowe, współżycie z bakteriami 259
Rzeki — ocena zanieczyszczenia organicznego systemem saprobów 47
Rzeki — określenie samooczyszczania się metodą statystyczną 131
Rzeki zanieczyszczone ściekami — badania nad samooczyszczaniem się . 77
Salmonella w ściekach i zanieczyszczonej wodzie 27
Samooczyszczanie się rzeki zanieczyszczonej ściekami z fabryki celulozy . . 77
Samooczyszczanie się rzek określane metodą statystyczną 131
Saproby — zastosowanie do badań zanieczyszczonych rzek 47
Seradela, rozwój narośli korzeniowych u różnych odmian 301
Rhizobium — próby przyspieszenia rozwoju powoli rosnących szczepów . . 333
Siarczany, usuwanie drogą redukcji biologicznej z ścieków 169
Soja, wpływ azotu na symbiozę i rozwój 315
Streptomyces alni, wiązanie azotu cząsteczkowego 283
Ścieki cukrownicze, procesy biologiczne w oczyszczaniu w stawach biologicznie czynnych 185
Ścieki **drożdżowni** i **krochmalni**, oczyszczanie przy pomocy osadu czynnego 145
Ścieki **z fabryki celulozy**, kinetyka samooczyszczania się rzeki zanieczyszczonej 77
Ścieki **z kopalni soli** zanieczyszczające rzeki, ocena zanieczyszczenia metodą saprobów 47
Ścieki **mleczarskie**, oczyszczanie metodą osadu czynnego 175
Ścieki, **oczyszczanie**, podstawy biologiczne 135
Ścieki **piwowarskie**, przemiany biochemiczne 111
Ścieki **przemysłu chemicznego** i **energetycznego**, wpływ na stan mikrobiologiczny wód 125
Ścieki **przemysłowe**, metody badań laboratoryjnych nad oczyszczaniem . . 151
Ścieki przemysłowe, **fenolowe**, wykorzystanie swoistych biocenoz do oczyszczania 165
Ścieki **przemysłu włókien sztucznych**, usuwanie siarczanów drogą redukcji biologicznej 169
Ścieki **sanatoriów przeciwgruźliczych**, chlorowanie 181
Ścieki i **wody powierzchniowe** — mikrobiologia — stan badań w Polsce . . 7
Ścieki i **wody zanieczyszczone** — występowanie *Salmonella* 27
Ścieki i wody zanieczyszczone — metoda analiz mikrobiologicznych . . . 33
Ścieki, **zastosowanie ultrafiltrów** membranowych do badań mikrobiologicznych 41
Ścieki **zanieczyszczające** wody basenu portowego, charakterystyka biologiczna wód 57
Szczepionki, dla roślin motylkowych, wyrób 321
Tkanka bakteroidalna, rozwój w narośla korzeniowych łubinu 299
Ultrafiltry membranowe — zastosowanie do badań mikrobiologicznych ścieków 41
Wiązanie wolnego azotu, mechanizm 271
Wiązanie wolnego azotu w czystych kulturach *Streptomyces alni* 283
Wody basenu portowego, charakterystyka biologiczna 57
Wody **dorzecza** południowej Wisły, charakterystyka mikrobiologiczna . . . 91
Wody z **filtrów** pospiesznych, charakterystyka występujących bakterii . . 67

Wody **powierzchniowe**, badania hydrobiologiczne 21
Wody powierzchniowe zanieczyszczone ściekami — mikrobiologia — stan badań w Polsce 7
Wody **rzek**, zanieczyszczone ściekami kopalni soli, ocena metodą saprobów 47
Wody rzeki, zanieczyszczonej ściekami, samooczyszczanie się 131
Wody rzek podgórskich, wpływ ścieków przemysłu chemicznego i energetycznego 125
Wody rzek górskich, charakterystyka mikrobiologiczna i hydrobiologiczna . 129
Wody i **ścieki** — występowanie *Salmonella* 27
Wody i ścieki — metoda analiz mikrobiologicznych 33
Wywary posiarczynowe świerkowe, oczyszczanie 115

SPIS TREŚCI

Str.
Page

1. J. Marszewska-Ziemięcka: Z zagadnień cytologii i fizjologii *Rhizobium*. Referat przeglądowy
Some problems in the cytology and physiology of *Rhizobium*. A review 209
2. Z. Lorkiewicz: Z zagadnień zmienności i genetyki *Rhizobium*. Referat przeglądowy
Some problems concerning variability and genetics of *Rhizobium*. A review 225
3. J. Żelazna: Protoplasty i penicylinoza w *Rhizobium* . . . . . .
Protoplasts and the penicilinase of *Rhizobium* 235
4. D. Drożańska: Budowa antygenowa różnych szczepów *Rhizobium*
Structure of antigens in different strains of *Rhizobium* 249
5. M. Kowalski i R. Staniewski: Wstępne badania nad wrażliwością różnych szczepów *Rhizobium* na fagi.
Preliminary investigations on the susceptibility of different strains of *Rhizobium* to phages 253
6. J. Gołębiowska: Niektóre zagadnienia współżycia roślin motylkowych z bakteriami. Referat przeglądowy
Some problems concerning the symbiosis of leguminous plants with bacteria. A review 259
7. A. Nowotny-Mieczyńska: Niektóre problemy mechanizmu wiązania wolnego azotu. Referat przeglądowy
The mechanism of biological nitrogen fixation. A review 271
8. M. Fiuczek: Wiązanie azotu atmosferycznego w czystych kulturach *Streptomyces alni*
Atmospheric nitrogen fixation in pure culture of *Streptomyces alni* . . 283
9. J. Niewiarowska: Symbioza u rokitnika
Symbiosis in *Hippophae rhamnoides* 289
10. A. Drozdowicz: W sprawie oporności roślin na zakażenia nieswoistym szczepem *Rhizobium*. Doniesienie.
On the resistance of leguminous plants against the infection with a nonspecific strain of *Rhizobium* 295
11. J. Gołębiowska i U. Sypniewska: Wpływ rośliny na rozwój jej współżycia z *Rhizobium*. I. Rozwój tkanki bakteroidalnej w naroślach korzeniowych różnych odmian łubinu. Doniesienie.
The influence of the host plant on the development of its symbiosis with *Rhizobium*. I. The influence of different species and varieties of lupine on the development of bacteroids in their nodules 299
12. U. Sypniewska: Wpływ rośliny na rozwój jej symbiozy z *Rhizobium*. II. Rozwój narośli korzeniowych u różnych odmian i rodów seradeli. Doniesienie.
The influence of the host plant on the dewelopment of its symbiosis with *Rhizobium*. II. The development of the nodules on different varieties of serradilla 301

Str.
Page

13. J. Buśko: Uzdolnienie symbiotyczne i niektóre cechy fizjologiczne bakterii brodawkowych współżyjących z komonicą i przelotem. Doniesienie
Symbiotic effectiveness and some physiological properties of the nodule bacteria of *Lotus* and *Anthyllis* 303
14. A. Nowotny-Mieczyńska i J. Zinkiewicz: Wpływ żywienia rośliny na aktywność *Rhizobium trifolii* w symbiozie z koniczyną. Doniesienie
The symbiotic effectiveness of *Rhizobium trifolii*, as influenced by the nutrition of the host plant 309
15. Z. Uziakowa: Wpływ różnych form azotu na rozwój i symbiozę soi. Doniesienie
The influence of different forms of nitrogen-nutrition upon the growth and symbiosis of soy-beans 315
16. T. Wróbel: Wyrób szczepionek i wyniki szczepienia nimi roślin motylkowych. Referat przeglądowy
Production of cultures of *Rhizobium* for leguminous plants and the results of their application in field experiments. A review 321
17. K. Bereśniewicz: Próby przyspieszenia rozwoju powoli rosnących szczepów *Rhizobium*
Studies on the acceleration of the development of the slow growing strains of *Rhizobium* 333
18. Wnioski z Konferencji 339

Indeks 341

Warunki prenumeraty

Cena w prenumeracie zł 100 rocznie, zł 50 półrocznie. Zamówienia i wpłaty przyjmują:

1. Przedsiębiorstwo Upowszechnienia Prasy i Książki „Ruch", Wrocław, ul. Oławska 10/11, konto PKO nr 8-6-13768.

2. Urzędy pocztowe.

Prenumerata ze zleceniem wysyłki za granicę — 40% drożej. Zamówienia dla zagranicy przyjmuje Przedsiębiorstwo Kolportażu Wydawnictw Zagranicznych „Ruch", Warszawa, ul. Wilcza 46, konto PKO nr 1-6-100024. Bieżące numery do nabycia w księgarniach naukowych „Domu Książki" i we Wzorcowni PWN, Warszawa, ul. Miodowa 10.

Informacji w sprawie sprzedaży egzemplarzy z poprzednich lat udziela Centrala Kolportażu „Ruch". Sprzedaż Prasy Zdeaktualizowanej, Warszawa, ul. Srebrna 12, oraz Wzorcownia PWN, Warszawa, ul. Miodowa 10.

Placówki „Ruchu"

Warszawa, ul. Nowopiękna 3
Warszawa, ul. Nowy Świat 72, Pałac Staszica
Warszawa, ul. Wiejska 14
Białystok, ul. Lipowa 1
Bielsko-Biała, ul. Lenina 7, kiosk nr 1
Bydgoszcz, ul. Armii Czerwonej 2
Bytom, Pl. Kościuszki, sklep nr 39
Chorzów, ul. Wolności 54
Ciechocinek, kiosk nr 4, „Pod Grzybkiem"
Częstochowa, II Aleja 26
Gdańsk, ul. Długa 33/34
Gdynia, ul. Świętojańska 27
Gliwice, ul. Zwycięstwa 47
Gniezno, ul. Mieczysława 31
Grudziądz, ul. Mickiewicza, sklep nr 5
Inowrocław, ul. Marchlewskiego 3
Jelenia Góra, ul. 1 Maja 1
Kalisz, ul. Śródmiejska 3
Katowice Zach., ul. 3 Maja 28
Kielce, ul. Sienkiewicza 22
Koszalin, ul. Zwycięstwa 38
Kraków, Rynek Główny 32
Krynica, Stary Dom Zdrojowy
Lublin, ul. Krakowskie Przedmieście 29
Łódź, ul. Piotrkowska 200
Nowy Sącz, ul. Jagiellońska 10
Olsztyn, pl. Wolności (kiosk)
Opole, Rynek, sklep nr 76
Ostrów Wlkp., ul. Partyzancka 1
Płock, ul. Tumska, kiosk nr 270
Poznań, ul. Dzierżyńskiego 1
Poznań, ul. Głogowska 66
Poznań, ul. 27 Grudnia 4
Przemyśl, pl. Konstytucji 9
Radom, ul. Moniuszki 5
Rzeszów, ul. Kościuszki 5
Sopot, ul. Monte Cassino 32
Sosnowiec, ul. Czerwonego Zagłębia, kiosk nr 18 (obok dworca)
Szczecin, Al. Piastów — róg Jagiellońskiej
Toruń, Rynek Staromiejski 9
Wałbrzych, ul. Wysockiego, obok Placu Grunwaldzkiego
Włocławek, Pl. Wolności, róg ul. 3 Maja
Wrocław, Pl. Kościuszki, kiosk nr 9
Zabrze, Pl. 24 Stycznia, kiosk nr 50
Zakopane, ul. Krupówki 51
Zielona Góra, ul. Świerczewskiego 38

Księgarnie naukowe „Domu Książki"

Warszawa, Krakowskie Przedmieście 7
Kraków, ul. Podwale 6
Łódź, ul. Piotrkowska 102a
Poznań, ul. Armii Czerwonej 69
Wrocław, Rynek 60

Cena zł 50,—